

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in **Biologia Marina**

**Espressione di geni correlati allo stress ossidativo  
nell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri* esposta a  
diverse condizioni ambientali nella Laguna di  
Venezia**

**Tesi di Laurea in Adattamenti degli animali  
all'ambiente marino**

Relatore  
Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da  
Stefano Tasselli

Correlatore  
Prof. Lorian Ballarin

II sessione  
Anno Accademico 2014/2015



# INDICE

<b>Riassunto</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>4</b>
1.1 <i>Biomarkers</i>	4
1.2 Stress ossidativo	5
1.3 Stress ossidativo in ambiente marino	6
1.4 Meccanismi di difesa antiossidanti	8
1.5 Superossido dismutasi	8
1.6 Glutathione	10
1.7 Glutammato cistein ligasi e Glutathione sintetasi	11
1.8 Glutathione perossidasi	12
1.9 Phylum Chordata	15
1.10 Subphylum Urochordata	15
1.11 Classe Ascidiacea	16
1.12 <i>Botryllus schlosseri</i>	17
1.13 Emociti di <i>B. schlosseri</i>	19
<b>2. Scopo della ricerca</b>	<b>22</b>
<b>3. Metodiche sperimentali</b>	<b>23</b>
3.1 Stazioni di campionamento	23
3.2 Sistema per l'alloggiamento delle ascidie	24
3.3 Attività di campionamento	25
3.4 Estrazione RNA	26
3.5 Retrotrascrizione da RNA a cDNA	26
3.6 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR)	27
3.7 Ibridazione <i>in situ</i> (ISH)	28
3.7.1 Costruzione di sonde a RNA	29
3.7.1.1 Disegno dei primer	29
3.7.1.2 Retrotrascrizione mRNA	29
3.7.1.3 Ligazione	29

3.7.1.4 Trasformazione	30
3.7.1.5 Screening delle colonie	31
3.7.1.6 Purificazione del DNA plasmidico	31
3.7.1.7 Sequenziamento	31
3.7.1.8 Verifica dell'inserto	32
3.7.1.9 Amplificazione	32
3.7.1.10 Produzione della sonda	33
3.7.2 Ibridazione <i>in situ</i> tecnica "Whole Mount"	33
3.8 Estrazione proteica totale	35
3.9 Determinazione della concentrazione totale di proteine	35
3.10 Saggio di attività enzimatica della superossido dismutasi	36
3.11 Saggio di attività enzimatica della catalasi	37
3.12 Analisi statistica	38
<b>4. Risultati</b>	<b>39</b>
4.1 Siti di campionamento	39
4.2 Mortalità delle colonie	39
4.3 Parametri chimico-fisici dell'acqua di mare	41
4.4 Caratterizzazione ecologica dei siti	42
4.5 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR)	44
4.6 Ibridazione <i>in situ</i> (ISH)	45
4.7 Saggio di attività enzimatica della superossido dismutasi	46
4.8 Saggio di attività enzimatica della catalasi	47
<b>5. Discussione</b>	<b>48</b>
<b>6. Referenze bibliografiche</b>	<b>52</b>

## RIASSUNTO

I pattern di espressione genica vengono oggi largamente utilizzati per identificare l'esposizione degli organismi a condizioni ambientali stressogene. Le reazioni che consentono ad un organismo di sopravvivere anche in condizioni avverse possono essere quindi sfruttate come parametri per studiare, ad esempio, gli effetti subletali indotti dallo stress negli organismi esposti. Questo tipo di approccio trova larga applicazione in studi di monitoraggio ecologico e di valutazione del rischio ecologico. Nella maggior parte dei casi gli stress ambientali convergono in uno stress di tipo ossidativo negli organismi esposti e ciò porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Lo scopo di questa ricerca è valutare il possibile utilizzo dell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri* come *biomarker* per quanto riguarda l'ambiente lagunare.

*B. schlosseri* è un'ascidia coloniale cosmopolita, diffusa principalmente in mari poco profondi e temperati, in cui gli zoidi sono completamente immersi in una tunica amorfa percorsa da una rete di vasi sanguigni che interconnettono blastozoidi e gemme. Sistemi di 6-12 zoidi, disposti a formare una sorta di fiore, condividono un sifone cloacale. Una colonia può contenere numerosi sistemi. *B. schlosseri* può riprodursi sia per via asessuata (gemmazione) sia per via sessuata. In una colonia si ritrovano sempre tre generazioni blastogenetiche: gli zoidi adulti, le gemme di prima generazione sugli zoidi e le gemmule di seconda generazione sulle gemme. *B. schlosseri* è un organismo modello di notevole interesse in quanto: è facilmente reperibile in natura, è in grado di crescere e riprodursi in laboratorio, presenta un cambio generazionale rapido, la tunica che avvolge le colonie è trasparente e quindi esse sono facilmente osservabili al microscopio e i sistemi di grandi dimensioni possono essere frammentati per formare subcloni.

Per lo scopo di questa ricerca si è analizzato, dopo l'esposizione a diverse condizioni ambientali nella Laguna di Venezia, un gruppo di geni già studiato in *B. schlosseri* e che si sa essere coinvolto nello stress ossidativo.

In particolare, sono stati analizzati la subunità modulatore della glutammato cistein ligasi (GCLM) e la glutatione sintetasi (GS), enzimi coinvolti nella sintesi del glutatione, le 2 isoforme di glutatione perossidasi (GPx3 e GPx5), che si

ossidano per ridurre i composti tossici, e l'enzima superossido dismutasi (SOD) che rimuove  $O_2^-$  e lo converte in  $O_2$  e  $H_2O$ .

Le colonie sono state esposte in 3 siti della Laguna di Venezia con condizioni ambientali diverse per 22 giorni e sono state poi confrontate con colonie mantenute nelle vasche della Stazione Idrobiologica "Umberto d'Ancona" di Chioggia dove vengono abitualmente allevate. Solo in 2 siti è stato possibile recuperare le colonie in seguito all'esposizione. Questi siti sono: un pontile galleggiante modulare situato nella Laguna tra Chioggia e Sottomarina, (Sito 1), più vicino alla bocca di porto e sottoposto a modesta idrodinamicità data dal traffico dei natanti e dal loro ormeggio sul pontile stesso e la Laguna di Lusenzo, (Sito 2), più distante dalla bocca di porto, con bassa idrodinamicità e nessun traffico da natanti grazie ad una secca che occupa gran parte della Laguna (Laguna di Lusenzo). I siti sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico, attraverso una sonda multiparametrica, ed ecologico, per mezzo di un grattaggio. La Laguna di Lusenzo ha mostrato valori di pH e temperatura più alti rispetto al sito 1 e una totale assenza di Tunicati, trovati invece nel sito 1, che quindi sembrano non essere in grado di sopravvivere in questa condizione ambientale. Nel sito 2 è stata inoltre rilevata la mortalità più alta delle colonie e quelle sopravvissute mostravano una morfologia sofferente, con basso accrescimento rispetto all'inizio dell'esposizione. Questi dati suggeriscono quindi una condizione ambientale avversa nella Laguna di Lusenzo per la sopravvivenza di *B. schlosseri*.

Alla caratterizzazione dei siti si è poi aggiunta un'analisi molecolare e biochimica su campioni di *B. schlosseri* costituiti da un pool di 16 sistemi provenienti da 4 colonie geneticamente diverse esposte nello stesso sito. Le analisi mediante sqRT-PCR hanno mostrato un livello di espressione dell'intero gruppo di geni quasi doppio nelle colonie provenienti dal pontile galleggiante, (Sito 1), rispetto a quelle poste nelle vasche della Stazione Idrobiologica, (Sito 3), suggerendo un'attivazione della trascrizione di tali geni data dalla condizione ambientale non ottimale in cui questi organismi sono stati posti. La Laguna di Lusenzo, (Sito 2), ha mostrato invece dei livelli di espressione solo di poco superiori rispetto al sito di controllo per quanto riguarda l'intero gruppo di geni analizzato. Ciò potrebbe essere dato dalla condizione estrema in cui gli organismi sono stati esposti: *B.*

*schlosseri* si trova in una condizione di stress, vicina al collasso, tale da non riuscire più a far fronte alla pressione ambientale esterna. Il tutto porterebbe ad una assenza di trascrizione che si manifesta in un basso quantitativo di mRNA. Anche le analisi di attività enzimatica allo spettrofotometro potrebbero confermare questa teoria. L'attività enzimatica sia della SOD che della catalasi sono molto più alte nel sito 2 rispetto al sito 1. Nelle colonie provenienti dalla Laguna di Lusenzo, (Sito 2), gli organismi si trovano a dover affrontare un forte stress che si traduce in un'elevata attività enzimatica. Gli individui posti nel sito 1 hanno invece un'attivazione più modesta di entrambi gli enzimi in risposta ad una pressione ambientale minore. La localizzazione dei trascritti corrispondenti ai geni analizzati condotta tramite ibridazione *in situ* non ha invece rilevato alcuna marcatura in nessuno dei campioni. Questo può essere dato da un livello di espressione troppo basso per essere rilevato con una ribosonda sull'organismo *in toto*.

Tutti i dati raccolti sembrano quindi suggerire che *B. schlosseri* possa essere un buon indicatore per lo stato ecologico di un ambiente lagunare, entro parametri di pH e temperatura in cui questo organismo abitualmente vive. Un ambiente eccessivamente sfavorevole per questo organismo può portare ad una difficoltà nell'acquisizione di dati soprattutto a livello trascrizionale e quindi ad una valutazione incompleta degli effetti che un possibile stato ecologico alterato può avere sull'organismo stesso.

Questo lavoro di tesi rappresenta un primo passo verso la comprensione delle risposte fisiologiche di *B. schlosseri* in diverse condizioni ambientali. Ulteriori studi sono necessari per proporre *B. schlosseri* come *biomarker* per l'ambiente lagunare utilizzando, ad esempio, un maggior numero di individui per campione e caratterizzando ecologicamente i siti scelti in maniera più dettagliata e approfondita.

Di grande interesse può essere studiare singoli subcloni provenienti dalla stessa colonia in modo da ottenere campioni geneticamente uguali posizionati nei diversi siti indagati per osservare così l'influenza che un ambiente diverso ha su un genotipo completamente identico. Inoltre emerge chiara la necessità di accostare a studi di solo carattere trascrizionale anche analisi di attività enzimatiche che possono contribuire a chiarire scenari ancora oscuri di attivazione genica.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Biomarkers*

I pattern di espressione genica sono sempre più utilizzati per identificare l'esposizione a condizioni ambientali stressogene (Jeppe et al, 2014). Negli ambienti acquatici vengono utilizzati, ad esempio, per esaminare come gli organismi rispondano alle sostanze tossiche e hanno la potenzialità di identificare stress sub-letali che possono portare ad una degradazione ambientale (Adams et al, 1989; Galay-Burgos et al, 2003).

Generalmente, i *pathway* metabolici e le reazioni che consentono all'organismo di persistere in condizioni ambientali non favorevoli possono essere utilizzate come *biomarkers* per caratterizzare sia la situazione di esposizione stessa sia gli effetti indotti dallo stress negli organismi esposti (Adams et al, 1989; Depledge and Fossi, 1994). L'approccio attraverso *biomarker* utilizza le risposte degli organismi che vivono in condizioni non ottimali in modo da poterli utilizzare come sentinelle nell'allerta precoce e nella valutazione del rischio ecologico (Ham et al, 1997; Schramm et al, 1999).

I dati di trascrittomica, in tossicologia acquatica, contribuiscono nella comprensione dei meccanismi di tossicità, incluse le relazioni dosi-risposta, la differente sensibilità delle specie e la classificazione delle specifiche risposte biologiche a contaminanti chimici. Questo approccio inoltre può portare all'identificazione di nuovi *biomarker* e di effetti avversi non noti. L'influenza dell'ambiente sul trascrittoma o sul metaboloma di un organismo può essere sfruttata nel monitoraggio al fine di caratterizzare gli effetti di stress antropogenici come l'inquinamento. Così, anche se l'espressione genica può essere influenzata da diversi fattori, un subset di geni con un'espressione alterata può dare informazioni su una risposta ad uno stress (Van Aggelen et al, 2010).

Nella maggior parte dei casi questi stress convergono in uno stress di tipo ossidativo che porta a produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).



## 1.2 Stress ossidativo

Lo stress ossidativo si verifica quando i livelli di antiossidanti citosolici, che impediscono alle ROS di provocare danni alla cellula, diventano insufficienti. Esempi di ROS includono l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il radicale ossidrilico ( $OH^{\cdot}$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Ognuna di queste ROS è altamente reattiva e instabile. Questa conformazione permette la rapida interazione con macromolecole proteiche, lipidiche e con acidi nucleici. Così, quando le cellule non sono in grado di regolare sufficientemente il livello di ROS o di rimuovere e rimpiazzare le macromolecole ossidate, possono verificarsi alterazioni cellulari che includono l'accumulo di molecole danneggiate in seguito ad ossidazione, incremento del livello di macromolecole alterate e molteplici disfunzioni nell'omeostasi cellulare (Cecarini et al, 2006).

Le ROS sono prodotte in animali e piante in seguito a diversi meccanismi tra cui l'azione di NADPH-ossidasi, ossidasi mitocondriale e ossidasi microsomale (Gamelei et al, 1996; Tarchewskii, 2002). I siti di maggior produzione sono i mitocondri (Boveris e Cadenas, 1982; Chance et al, 1979; Brand et al, 2005), i microsomi (Staats et al, 1988), i perossisomi (Dhaunsi et al, 1992; Corpas et al, 2001) e il citosol (Shaw e Jayatilleke, 1990). Le ROS vengono prodotte anche in seguito all'azione dei fagociti a cui consegue l'assemblaggio e l'attivazione di un'ossidasi localizzata a livello della membrana del fagolisosoma. Quest'enzima catalizza la riduzione dell'ossigeno molecolare a radicale superossido, utilizzando come cofattore il NADPH-ridotto. Dall'anione superossido si forma poi il perossido di idrogeno e da questo lo ione ipoclorito e il radicale ossidrilico ( $OH^{\cdot}$ ) responsabili dell'azione microbica all'interno dei fagolisosomi (Cecarini et al, 2006).

### **1.3 Stress ossidativo in ambiente marino**

In aggiunta ai meccanismi biologici di generazione di ROS ci sono anche fonti esogene di radicali liberi come radiazioni ultraviolette (Masaki et al, 1995), presenza di contaminanti (Monari et al, 2005), ossigeno disciolto (Matozzo e Marin, 2005), temperatura (Camus et al, 2000), salinità (Gagnaire et al, 2006), disponibilità di cibo (Matozzo et al, 2005).

Gli organismi marini sono esposti ad una grande varietà di fattori biotici e abiotici che variano su scala spaziale e temporale (Aruda et al, 2011; Clark and Peck 2009; Cottin et al, 2010; Huang et al, 2011; Lockwood et al, 2010). Proprio per questo motivo essi devono continuamente modificare le strategie di risposta allo stress, che portano sovente alla produzione di ROS, in modo da mantenere l'omeostasi per crescere, riprodursi ed evitare lo stress ossidativo e il danneggiamento cellulare (Lesser, 2006).

Molti studi hanno dimostrato che modificazioni di temperatura e salinità, frequenti in ambienti marini marginali o antropici come estuari, lagune, baie e porti (Pineda et al, 2012), possono influenzare i meccanismi di difesa degli invertebrati marini alterando l'attività degli emociti che contengono enzimi idrolitici ed ossidativi, questi ultimi in grado di produrre ROS implicate nella degradazione dei patogeni (Gagnaire et al, 2006). In base alla durata e all'estensione dello stress, l'organismo può ristabilirsi, sopravvivere per un certo periodo con una fitness più bassa, oppure morire.

Gli organismi marini dimostrano, in generale, una notevole capacità di omeostasi e di protezione dalle ROS. Spugne con cianobatteri simbiotici sono sottoposte ad elevate pressioni parziali di  $O_2$  nei loro tessuti che derivano dall'ossigeno prodotto fotosinteticamente. L'esposizione estiva alle alte temperature dell'acqua porta ad elevata capacità di scavenging e alta attività della catalasi, deputata alla rimozione di  $H_2O_2$  (Regoli et al, 2004). Lo stress ossidativo è stato inoltre proposto come meccanismo determinante nell'induzione dello sbiancamento dei coralli (Lesser, 1996; Lesser e Farrell, 2004), in seguito all'esocitosi delle zooxantelle dalle cellule dell'ospite oppure alla morte per apoptosi di queste ultime (Gates et al, 1992; Dunn et al, 2002). Anellidi mantenuti in condizioni anossiche aumentano l'attività della SOD; questo è un adattamento fisiologico per resistere alla transizione dall'anossia alla normossia e il conseguente incremento nella

produzione di ROS (Abele-Oeschger et al, 1994). Artropodi marini come granchi, aragoste e gamberetti modificano le loro difese antiossidanti in base al livello del proprio metabolismo aerobio, esposizione cronica ad ambienti freddi o esposizione ai raggi UV (Maciel et al, 2004; Camus e Gulliksen, 2005; Gouveia et al, 2005).

È risaputo che fattori biotici e abiotici possono influenzare i meccanismi di difesa degli emociti dei molluschi. Uno dei più importanti fattori ambientali coinvolto nell'immunomodulazione dei bivalvi è la temperatura dell'acqua (Monari et al, 2006; Fisher, 1988). Lo stress termico porta generalmente a stress ossidativo in molte specie di molluschi marini, che risulta in un cambiamento nell'attività degli enzimi antiossidanti (Abele et al, 2002).

Gli studi sullo stress ossidativo negli echinodermi sono pochi. Larve di riccio di mare esposti a radiazioni UV hanno mostrato sintomi di stress ossidativo, come ad esempio elevati livelli di SOD, danneggiamento del DNA e apoptosi (Lesser et al, 2003).

I pesci hanno diverse SOD che si sono evolute in modo da mantenere la loro funzione catalitica in un range molto ampio di temperature (Cassini et al, 1997; Abele e Puntarulo, 2004 e sono in grado di rispondere anche alla pressione ossidativa data da differenze nei tassi metabolici (Janssens et al, 2000), inquinamento (Bacanskas et al, 2004) e esposizione ai raggi UV (Lesser et al, 2001).

Poco si sa sulla tolleranza allo stress nelle ascidie e nei geni coinvolti nella risposta allo stress e nella sua regolazione. I geni correlati allo stress, infatti, sono stati descritti in modo esteso solo in una specie, l'ascidia *Ciona intestinalis* (Dehal et al 2002, Fujikawa et al, 2010; Franchi et al, 2011; Franchi et al 2012; Ferro et al, 2013), della quale è stato completamente sequenziato il genoma. Negli ultimi anni, alcuni studi si stanno focalizzando sulla caratterizzazione e l'espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo nell'ascidia coloniale *B. schlosseri* (Franchi et al, 2015, sottomesso).

#### 1.4 Meccanismi di difesa antiossidanti

Si possono distinguere due tipi di meccanismi antiossidanti che gli organismi hanno evoluto al fine di limitare i danni provocati dalle ROS: di tipo enzimatico e non enzimatico (Manduzio et al, 2004). I principali enzimi ad attività antiossidante sono rappresentati dalla superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutazione reduttasi (GR), la glutazione perossidasi (GPx) e la glutazione S-transferasi (GST) (Cadenas, 1989). I meccanismi non enzimatici utilizzano il glutazione ridotto (GSH), le metallotioneine (Thornalley e Vasak, 1985) e le fitochelatine (Hughes e Sturzenbaum, 2007).

#### 1.5 Superossido dismutasi

L'enzima SOD è una componente importante del sistema di difesa antiossidante ed è presente in tutti gli organismi aerobi. Questo enzima catalizza la reazione attraverso la quale il  $O_2^-$  è rimosso e trasformato in  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Lin et al, 2008) (Reazione 1).



**Reazione 1.** Reazione catalizzata dalla SOD

La SOD è una metallo-proteina e, in funzione del metallo in essa contenuto, si possono distinguere tre tipi di SOD: ferro SOD (Fe-SOD), manganese SOD (Mn-SOD) e rame/zinco SOD (Cu/Zn SOD) (Brower et al, 1993).

Esistono due forme di Cu/Zn SOD: una extracellulare (EC-Cu/Zn SOD), che porta nella regione N-terminale un peptide segnale per la secrezione (Lin et al, 2008; Bao et al, 1976; Cheng et al, 2006), ed una intracellulare (IC-Cu/Zn SOD) che non possiede il peptide segnale e viene chiamata SOD I.

La produzione di ROS in seguito a stress ossidativo va a stimolare l'espressione della Cu/Zn SOD per la sua funzione antiossidante (Homblad et al, 1999; Campa-Cordòva et al, 2002).

Relativamente alle ascidie, sono state caratterizzate due Cu/Zn SOD in *Ciona intestinalis*, l'isoforma extracellulare Ci-SODa e l'isoforma intracellulare Ci-SODb. L'mRNA delle due Cu/Zn SODs è stato localizzato negli emociti e nelle

cellule follicolari dell'ovario attraverso analisi di ibridazione *in situ*. Attraverso RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR) è stata riscontrata una sovraespressione di Ci-SODa e un'inibizione di Ci-SODb in presenza di metalli quali cadmio, zinco e rame. È stata poi indagata la possibile induzione dell'espressione di questi geni cercando delle specifiche sequenze a livello delle regioni promotrici che potessero guidare il processo di trascrizione in presenza di uno stress specifico. Esempi di tale sequenze sono i *metal response elements* (MRE) e gli *antioxidant response elements* (ARE). Per Ci-SODb non è stato possibile svolgere questa ricerca poiché il suo promotore è ancora sconosciuto. Per Ci-SODa sono state trovate tre sequenze MRE putative. Ciò indica che la sovraespressione di Ci-SODa, riscontrata dopo l'esposizione a Cu e Zn, è collegata ad un effetto diretto di questi metalli sulla trascrizione. L'assenza di ARE sembra invece suggerisce una trascrizione costitutiva del gene nelle cellule e una regolazione della presenza della proteina attiva solo a livello post-trascrizionale. L'insieme di questi dati suggerisce un ruolo di protezione contro i metalli non essenziali, tossici già a basse concentrazioni, per Ci-SODb e un ruolo di protezione contro l'eccesso di metalli essenziali come Cu e Zn per Ci-SODa (Ferro et al, 2013).

In *B. schlosseri* è stata trovata una Cu/Zn SOD con sequenza proteica di 148 amminoacidi, lunghezza simile a quella riscontrata in altri deuterostomi e presenza del dominio *Cu-Zn Superoxide Dismutase superfamily*. Da un'analisi di sequenza proteica, la SOD di *B. schlosseri* risulta priva di peptide segnale all'estremità N-terminale e può quindi essere indicata come isoforma intracellulare o SOD I. La sua espressione ha mostrato un aumento in seguito al trattamento con metalli pesanti, noti induttori di stress ossidativo. L'ibridazione *in situ* ha mostrato una marcatura delle cellule morulari e dei macrofagi (vedi oltre) durante il cambio di generazione *take over* dovuta all'intensa fagocitosi di cellule apoptotiche da parte dei fagociti che causa un eccesso di ROS e una marcatura dei macrofagi in *mid cycle* dovuta al processo fagocitico (Franchi et al, 2015, sottomesso).

## 1.6 Glutazione

I composti che contengono tioli sono importanti in molte reazioni biologiche. I ponti disolfuro tra cisteine hanno un ruolo importante nel determinare la struttura terziaria di una proteina e in molti farmaci la cisteina è il centro reattivo che ne determina gli effetti.

Il glutatione (GSH) è un tripeptide costituito da glutammato, cisteina e glicina, che si trova in concentrazioni dell'ordine del millimolare all'interno delle cellule. È la più abbondante molecola non proteica contenente tioli.

La risposta cellulare allo stress spesso implica cambiamenti nel contenuto di tioli, che sono i primi ad essere consumati nelle reazioni che proteggono la cellula rimuovendo i composti tossici e venendo poi rimpiazzati attraverso la riduzione enzimatica di un disolfuro oppure sintetizzati *ex novo* (Dickinson e Forman, 2002). Il GSH, infatti, essendo un tiolo, gioca un importante ruolo nella difesa antiossidante, nella detossificazione da xenobiotici, nella regolazione del ciclo cellulare e dell'espressione genica e appartiene quindi ai meccanismi di difesa antiossidanti di tipo non enzimatico (Ketter, 1982; Meister, 1983; Ziegler, 1985; Reed e Fariss, 1984; Arrigo, 1999). Il GSH è implicato nella difesa antiossidante in diversi modi: è substrato di enzimi antiossidanti, scavenger di ROS, è in grado di riattivare numerosi enzimi inattivati dallo stress ossidativo e contribuisce alla rigenerazione della vitamina E (Storey, 1996). In particolare, il GSH può essere ossidato dalle ROS prodotte in condizione di stress ossidativo (Hansen et al, 2007); il tiolo della cisteina integrata nel glutatione permette infatti di ridurre le ROS attraverso una reazione catalitica spontanea (Franco et al, 2007; Meister and Anderson, 1983). Differenti condizioni possono cambiare il contenuto intracellulare di GSH. Tra queste, la presenza di metalli pesanti (Woods e Ellis, 1995), lo *shock* termico (Kondo et al, 1993) e l'esposizione alle ROS che ne promuovono la sintesi enzimatica (Rahman et al, 1996). In condizioni di stress ossidativo si osserva un aumento dell'attività della glutatione reduttasi, l'enzima responsabile del ripristino del glutatione ridotto dalla sua forma ossidata attraverso l'uso del NADH e dei livelli di glutatione ossidato (Viguie et al, 1993). Il ruolo antiossidante del GSH varia in funzione della sua concentrazione, tasso di turn-over e di sintesi (Potter et al, 1993). La sintesi del GSH è intracellulare e

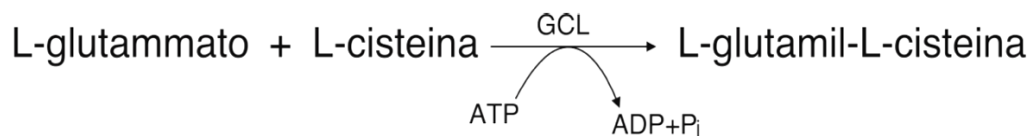
avviene per opera di due enzimi: la  $\gamma$ -glutamyl cistein ligasi, detta anche glutammato cistein ligasi (GLC) e la glutatione sintetasi (GS) (Reazione 2).



**Reazione 2.** Biosintesi del glutatione. **1)** Glutammato cistein ligasi (GCL);  
**2)** Glutatione sintetasi (GS).

### 1.7 Glutammato cistein ligasi e Glutatione sintetasi

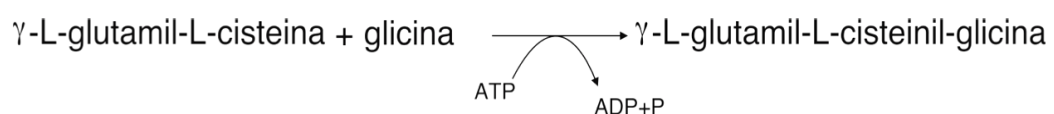
L'enzima glutammato cistein ligasi (GCL) è composto da due subunità, una modulatoria (GCLM) ed una catalitica (GCLC) e catalizza il primo passaggio, ATP-dipendente, della sintesi del glutatione (Reazione 3).



**Reazione 3.** Reazione catalizzata dal primo enzima nella biosintesi del glutatione.

La subunità catalitica, che è più grande e contiene il sito attivo, è responsabile del legame ATP-dipendente tra il gruppo amminico della cisteina (Cys) e il gruppo  $\gamma$ -carbossilico del glutammato (Glu) che porta alla formazione del dipeptide  $\gamma$ -glutamylcisteina ( $\gamma$ -GC). La subunità regolatoria, con minor peso molecolare, interagisce con GCLC aumentandone l'efficacia. Condizioni di stress ossidativo vanno a stimolare l'attività dell'enzima, favorendo l'associazione delle due subunità. Il glutatione, agendo sul bilancio redox, va ad agire sulla sua stessa sintesi attraverso un meccanismo a feedback negativo che quindi limita l'attività della GCL (Huang et al, 1993).

L'altro enzima coinvolto nella sintesi del glutatione è la glutatione sintetasi (GS), che catalizza, con una reazione ATP-dipendente, il legame di una  $\gamma$ -L-glicina al dimero formato nella prima reazione ( $\gamma$ -GC) per formare una molecola di  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cistein-glicina (glutatione o GSH) (Reazione 4).



**Reazione 4.** Seconda reazione della biosintesi del glutatione.

In *B. schlosseri* è stata trovata una proteina putativa (289 amminoacidi) con struttura simile alla subunità modulatoria delle GCL di altri deuterostomi. Studi di ibridazione *in situ* per l'enzima GCLM hanno mostrato marcatura delle cellule morulari durante la fase di cambio generazionale, o *take over* (vedi oltre), che comporterebbe un elevato metabolismo cellulare con aumento di ROS e una marcatura dei fagociti (vedi oltre) legata alla liberazione di ROS che si verifica durante il processo di efferocitosi (fagocitosi delle cellule apoptotiche). Quest'ultima ipotesi viene poi confermata dall'assenza di trascritto evidenziabile a livello degli amebociti, fagociti non ancora impegnati nella fagocitosi e, di conseguenza, con ridotta produzione di ROS (Franchi et al, 2015, sottomesso).

Per quanto riguarda l'altro enzima coinvolto nella sintesi del glutathione, il GS, in *B. schlosseri* presenta una sequenza proteica di 425 amminoacidi, più piccola rispetto a quella degli altri deuterostomi. Come per la GCLM, anche per questo enzima è stata trovata una marcatura delle cellule morulari (vedi oltre) in *take over* causata dall'aumento di ROS dovuto al ricambio generazionale e dai macrofagi, sia in *mid cycle* sia in *take over*, data dal processo fagocitico.

In seguito al trattamento con un agente stressogeno (LPS), i geni coinvolti nella sintesi del GSH non mostrano variazioni di espressione, cosa che invece si osserva per quanto riguarda la Cu/Zn SOD. Questo potrebbe suggerire un'attivazione dei meccanismi di difesa enzimatici preferibilmente a quelli non enzimatici, in risposta all'alterazione dello stato redox dei tessuti (Franchi et al. 2015, sottomesso).

### **1.8 Glutathione perossidasi**

L'enzima glutathione perossidasi catalizza la rimozione dei perossidi che si formano nel corso del metabolismo negli organismi aerobi. Nei mammiferi sono state trovate otto isoforme di Gpx, classificate in base a struttura primaria, specificità dell'accessibilità al substrato e localizzazione tissutale (Arthur, 2000; Tosatto et al, 2008). La maggior parte delle Gpx contiene un residuo di selenocisteina nella parte N-terminale, cioè un atomo di selenio legato covalentemente ad una cisteina. L'incorporazione del selenio negli Eucarioti avviene durante la sintesi proteica quando sulla 3' UTR dell'mRNA è presente una regione conservata che forma una struttura a stem-loop indicata come SECIS



(sequenza per l'inserimento della selenocisteina) che permette il riconoscimento del codone TGA come segnale per l'inserimento della selenocisteina invece che come codone di STOP. Il selenio è essenziale per l'attività catalitica dell'enzima e lo rende maggiormente reattivo come riducente: il gruppo selenoidrilico della selenocisteina ha infatti un pK minore rispetto al gruppo sulfidrico della cisteina. Di conseguenza, se la selenocisteina venisse sostituita dal suo analogo solforato, la cisteina, l'attività dell'enzima si ridurrebbe fortemente (Ursini e Gion, 2008).

La reazione catalizzata da questo enzima porta all'ossidazione del GSH in GSH ossidato (GSSG) anche se il GSH non reagisce direttamente con gli idroperossidi. La Gpx, avendo il selenio che funge da donatore di elettroni, si ossida per ridurre il composto tossico e utilizza poi il GSH per ripristinare la sua forma ridotta producendo quindi GSSG (Cohen e Hochstein, 1963) (Reazione 5).



**Reazione 5.** Reazione catalizzata dall'enzima perossidasi.

Il GSSH viene poi nuovamente ridotto in GSH grazie all'enzima glutatione reduttasi che ossida il NADPH. Durante lo stress ossidativo si verifica quindi un aumento transiente del livello di GSSG che viene ridotto rapidamente dalla glutatione reduttasi (Viguie et al, 1993).

Per quanto riguarda le Gpx, in *B. schlosseri* ne sono state individuate due isoforme differenti. La prima è stata riunita nel gruppo delle GPx3 con le quali condivide la presenza di un peptide segnale e la selenocisteina. Essa presenta una sequenza proteica di 211 amminoacidi e contiene al suo interno un dominio conservato *GSH peroxidase* necessario per catalizzare la riduzione degli idroperossidi utilizzando il GSH come donatore di elettroni; inoltre, nel sito attivo sono conservati gli amminoacidi fondamentali per l'attività catalitica dell'enzima (C<sup>161</sup>, Q<sup>95</sup>, W<sup>173</sup>). Dall'ibridazione *in situ* condotta su colture emocitarie di *B. schlosseri* con la sonda antisenso specifica per la GPx 3 si è ottenuta una marcatura delle cellule morulari in *take over* e dei macrofagi in *mid cycle* (vedi oltre). Questo profilo di espressione ricorda quello della GCLM visto in precedenza, in cui la marcatura in *take over* riguarda le cellule di nuova

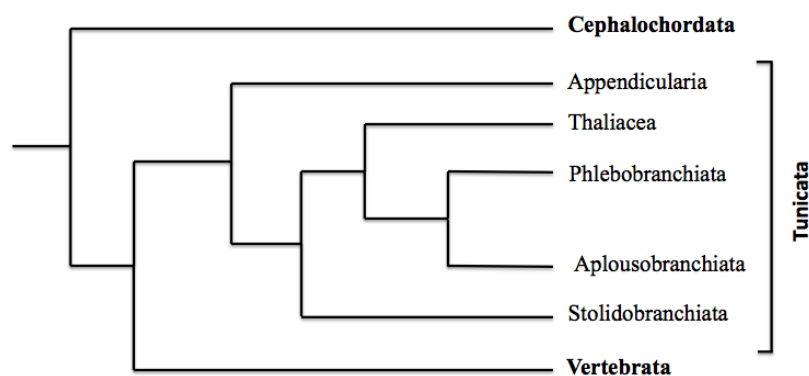
formazione, mentre la marcatura in *mid cycle* riguarda i macrofagi coinvolti nell'ingestione di materiale *non self*.

La seconda Gpx ritrovata in *B. schlosseri* è stata riunita nel gruppo delle Gpx5, vista l'assenza della Sec nel dominio conservato e la presenza di un peptide segnale. Essa è composta da una sequenza amminoacidica di 224 amminoacidi e contiene il dominio conservato *GSH peroxidase* ma solo uno dei tre amminoacidi conservati nel sito attivo (Q<sup>95</sup>). Il primo di questi tre amminoacidi è però una serina, la quale non possiede attività antiossidante. A pH fisiologico, infatti, l'OH della serina non si dissocia impedendo così la normale attività dell'enzima. La presenza di un nuovo amminoacido in questa posizione farebbe supporre l'esistenza di un ulteriore gruppo di GPx o di una mutazione in risposta ad un adattamento. In questo caso, l'ibridazione *in situ* con la sonda antisenso specifica per la GPx5 ha mostrato una marcatura delle cellule giovani indifferenziate, delle cellule morulari e dei macrofagi in *mid cycle* (vedi oltre), mentre nella fase di *take over* risultano marcati solo i macrofagi. In seguito a stimolazione con agenti stressogeni (LPS) si è notata una sovraespressione della sola GPx3 (Franchi et al, 2015, sottomesso).

## 1.9 Phylum Chordata

Il phylum Chordata appartiene al taxon dei Deuterostomi ed è caratterizzato da cinque elementi strutturali distintivi: la notocorda, il cordone nervoso tubulare dorsale, una faringe fessurata, l'endostilo e la coda postanale muscolare. Questi caratteri possono essere riscontrati sempre in stadi dell'embriogenesi, mentre possono scomparire o essere modificati in stadi successivi del ciclo vitale.

Il phylum Chordata si divide in tre subphyla: Cephalochordata, Urochordata o Tunicata e Vertebrata (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Albero filogenetico dei Cordati.

## 1.10 Subphylum Urochordata

Gli Urocordati o Tunicati sono organismi marini, filtratori, sessili o planctonici, solitari o coloniali. Il nome tunicati deriva dalla tunica, un rivestimento contenente un materiale semicellulosico (tunicina), mucopolisaccaridi, acqua e proteine strutturali (scleroproteine, collagene ed elastina), oltre a cellule, che circonda l'animale. La tunica è implicata in molteplici funzioni quali rivestimento, protezione meccanica, difesa, adesione al substrato e alloriconoscimento (Ruppert et al, 2007). Da adulti i Tunicati sono cordati altamente specializzati e nella maggior parte delle specie solo la larva giriniforme presenta tutti i caratteri distintivi del phylum. Durante la metamorfosi in adulti, la notocorda e la coda scompaiono, mentre il cordone nervoso dorsale si riduce ad un singolo ganglio.

Vertebrati e Tunicati sono filogeneticamente correlati e hanno un antenato in comune. Sulle relazioni filogenetiche dei vari subphyla dei Cordati si è molto discusso, soprattutto sulla questione di chi, tra Cefalocordati ed Urocordati, fosse il “sister group” dei vertebrati. Solo recentemente Delsuc (2006) sembra aver

risolto, con un approccio di filogenesi molecolare, la diatriba. Secondo questo studio sarebbero gli Urocordati il subphylum più vicino ai Vertebrati e non i Cefalocordati, come invece si riteneva, soprattutto su base morfologica.

Gli urocordati vengono tradizionalmente divisi in tre classi: Ascidiacea, Thaliacea e Appendicularia (Larvacea).

### **1.11 Classe Ascidiacea**

La classe Ascidiacea è la più numerosa del subphylum Tunicata e annovera circa 2300 specie, solitarie, coloniali o composte; sono tutti animali sessili. L'adulto ha un aspetto sacciforme ed è ricoperto da un'epiderma monostratificato al di sopra del quale si trova la tunica. Le cellule della tunica derivano in generale da emociti. In alcune specie coloniali, all'interno della medesima tunica si sviluppa un sistema di vasi che connettono i diversi individui, entro i quali scorre l'emolinfa.

L'ascidia adulta ha una forma sferica o cilindrica, con il volume corporeo occupato in gran parte dal cestello branchiale, che comunica con l'esterno mediante due aperture: un sifone inalante alla sommità e un sifone atriale o esalante laterale. Le Ascidie sono organismi filtratori: l'acqua penetra dal sifone inalante e passa nel sacco branchiale (faringe) attraverso la bocca. Sul lato medioventrale del sacco branchiale vi è un solco ciliato, l'endostilo, che secerne muco. Mentre il velo di muco viene spinto dalle ciglia sulla superficie interna del faringe verso la parte dorsale, esso intrappola le particelle alimentari in sospensione nell'acqua. Il muco, contenente le particelle di cibo, si arrotola e scorre posteriormente nell'esofago. L'acqua, ripulita dalle particelle alimentari, viene spinta dall'azione delle ciglia nella cavità atriale e infine all'esterno dal sifone esalante. L'intestino termina con un ano in prossimità del sifone esalante.

Il sistema circolatorio aperto è ben sviluppato con cuore tubulare ventrale, vasi e piccoli seni attraverso cui scorre l'emolinfa priva di pigmenti respiratori. Al fine di equilibrare la distribuzione dei metaboliti ai tessuti, in molte specie coloniali è presente l'inversione periodica del battito cardiaco con cambiamento della direzione del flusso emale.

Le ascidie presentano un'escrezione per accumulo in cui i cataboliti azotati sono immagazzinati in nefrociti localizzati in vari tessuti e liberati solo in seguito alla morte dello zoide (Ruppert et al, 2007).

Il sistema nervoso dell'adulto consta in un ganglio cerebrale, nervi della parete del corpo, nervo viscerale e plesso del cordone dorsale.

Nel mantello, formato da epidermide, epitelio peribranchiale e tessuto di origine mesenchimale, troviamo i fasci longitudinali di muscolatura liscia che si estendono dal sifone inalante alla base dell'addome. In entrambi i sifoni troviamo muscolatura circolare.

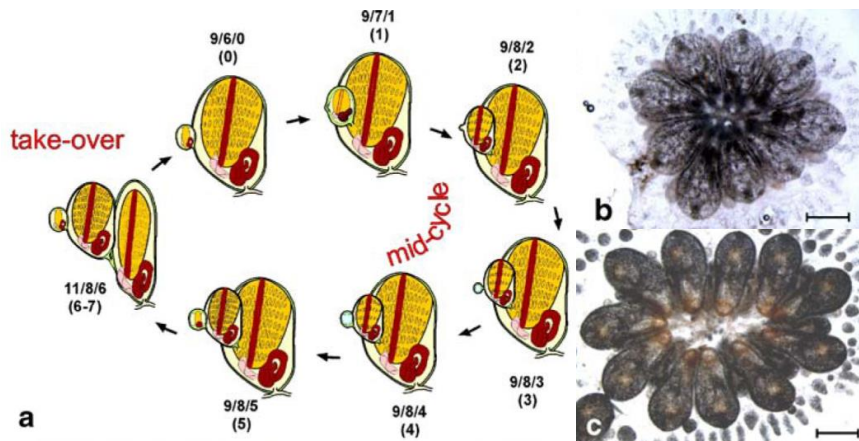
La riproduzione delle Ascidie può essere sia sessuata che asessuata (nelle specie coloniali). In seguito alla riproduzione sessuata, al termine dello stadio larvale liberamente natante, la larva si posa sul fondo, aderisce al substrato con tre papille adesive e metamorfosa riassorbendo i tessuti della coda e riorganizzando il corpo che ruota di 90° con aumento del numero delle fessure branchiali ed apertura dei sifoni verso l'esterno. Nelle specie coloniali, dall'individuo bentonico adulto, per gemmazione, si costituisce l'organizzazione coloniale formata da numerosi blastozoidi.

La classe Ascidiacea comprende tre ordini: Aplousobranchiata, Phlebobranchiata e Stolidobranchiata distinti sulla base della complessità del cestello branchiale (Burighel e Cloney, 1997).

### **1.12 *Botryllus schlosseri***

Agli Stolidobranchiati appartiene *B. schlosseri*, un'ascidia coloniale cosmopolita diffusa principalmente in mari poco profondi e temperati. I singoli zoidi sono immersi in una tunica comune amorfa percorsa da una fitta rete di vasi sanguigni che interconnettono blastozoidi e gemme e che si immette alla periferia in un vaso marginale; da quest'ultimo si diramano delle strutture a fondo cieco dette ampolle che permettono l'adesione della colonia al substrato (Zaniolo, 1981; Zaniolo e Trentin, 1987). Gruppi di 6-12 zoidi si dispongono a raggiera attorno al sifone cloacale comune, a formare un sistema. Gli zoidi di *B. schlosseri* misurano pochi millimetri ma, dato che una colonia può contenere numerosi sistemi, essa può raggiungere dimensioni di diverse decine di centimetri.

Condividendo tunica e sistema circolatorio, gli individui di una stessa colonia sono mantenuti allo stesso stadio di sviluppo. Oltre ad attuare la riproduzione sessuata con la formazione della larva giriniforme natante, questa specie è anche in grado di riprodursi per via agamica attraverso gemmazione. L'intera colonia rappresenta un clone e vi sono tre generazioni sempre presenti: l'adulto filtrante, le gemme primarie e le gemme secondarie (o gemmule). Alla temperatura di 18°C, con ritmo quasi settimanale, gli individui adulti regrediscono (fase di *take-over*) e vengono sostituiti dalle gemme primarie che diventano a loro volta adulti e, in seguito all'apertura dei sifoni, iniziano a filtrare. Le gemme di seconda generazione diventano quindi gemme primarie e producono gli abbozzi delle nuove gemme secondarie. Un ciclo coloniale blastogenetico può essere quindi definito come l'intervallo compreso tra l'apertura dei sifoni di una generazione di zoidi adulti e la successiva (Sabbadin, 1969). Gli stadi distanti più di un giorno dalla regressione vengono definiti stadi intermedi del ciclo blastogenetico (*mid-cycle*) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** a. Ciclo blastogenetico di *B. schlosseri*; b. *B. schlosseri* in Mid Cycle; c. *B. schlosseri* in Take Over. Barra= 1 mm. (Ballarin et al, 2008).

*B. schlosseri* viene studiato da tempo come modello, data la sua facile reperibilità in natura, la sua semplice allevabilità in laboratorio, le sue modalità di riproduzione e il cambio generazionale rapido, la possibilità di suddividere le colonie in subcloni geneticamente identici, la presenza di un sistema circolatorio vascolare nella tunica coloniale trasparente che ne permette una facile osservazione al microscopio e la conoscenza sia del genoma che del trascrittoma.

### 1.13 Gli emociti di *B. schlosseri*

L'emolinfa delle Ascidie è costituita da plasma trasparente e da una componente corpuscolare rappresentata dagli emociti (Figura 3). Su queste cellule sono stati condotti molti studi al fine di classificarle su base morfologica, funzionale e ultrastrutturale (Goodbody, 1974; Wright, 1981; Rowley et al, 1984). In *B. schlosseri* sono stati suddivisi in tre gruppi principali (Ballarin et al, 1994;1998; Cima et al, 2001):

#### 1) **Cellule indifferenziate** (emoblasti e cellule linfocito-simili)

Rappresentano la frazione minore di emociti circolanti. Hanno forma sferica, piccole dimensioni (4-5  $\mu\text{m}$ ), un grosso nucleo che occupa la maggior parte del citoplasma e uno o più nucleoli (Figura 1.3a). Da queste cellule si ritiene derivino tutti gli altri emociti (Ballarin e Cima, 2005).

#### 2) **Immunociti**

Sono le cellule del sangue deputate alle risposte di difesa immunitaria e sono a loro volta suddivisi in due linee differenziative funzionalmente diverse:

##### a) *Linea fagocitica* (amebociti ialini e cellule macrofago-simili)

Gli amebociti ialini (Figura 1.3b) presentano una forma irregolare, hanno dimensioni comprese tra 6-12  $\mu\text{m}$  e si spostano con movimenti ameboidi grazie a lunghi e sottili pseudopodi. Il citoplasma ialino presenta numerosi ribosomi, un apparato di Golgi ben sviluppato e numerosi granuli di glicogeno.

Le cellule macrofago-simili (Figura 1.3c) misurano 10-15  $\mu\text{m}$ , hanno forma sferoidale e nucleo ovale. Presentano numerosi lisosomi e fagosomi a livello citoplasmatico. È stato dimostrato che gli amebociti ialini e le cellule macrofago-simili rappresentano fasi diverse dello stesso tipo cellulare: i primi, dopo aver ingerito il materiale estraneo, retraggono gli pseudopodi e acquistano una forma sferoidale, diventando così cellule macrofago-simili (Ballarin et al, 1994).

##### b) *Linea citotossica* (amebociti granulari e cellule morulari)

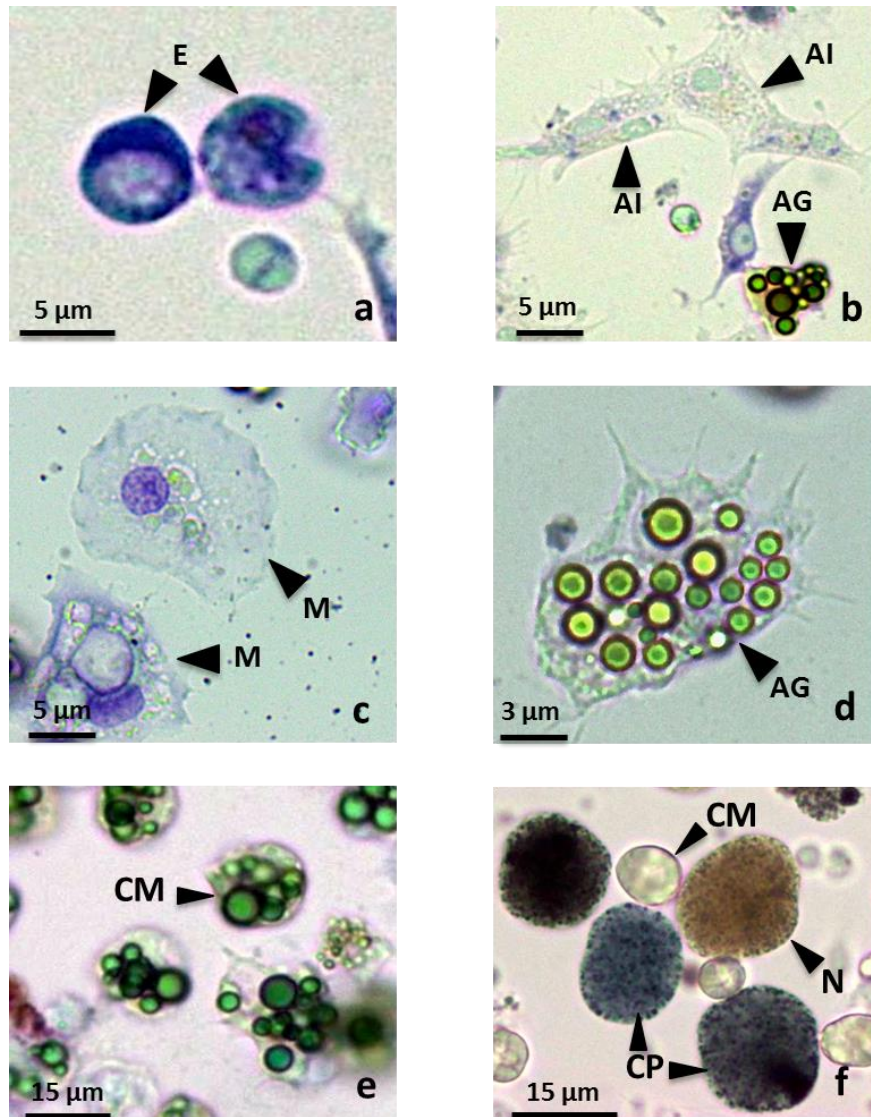
Gli amebociti granulari (Figura 1.3d) hanno un nucleo tondo circondato da un ampio spazio perinucleare. Nel citoplasma di queste cellule sono presenti piccoli vacuoli di 0,4-1,5  $\mu\text{m}$ . Si ritiene che queste cellule siano i precursori delle cellule morulari in quanto presentano caratteristiche citochimiche dei vacuoli simili (Ballarin et al, 1993).

Le cellule morulari (Figura 1.3e) presentano un diametro di 8-16  $\mu\text{m}$  e numerosi vacuoli contenenti sostanze riducenti ed enzimi ossidativi che conferiscono a queste cellule un aspetto simile a quello di una mora (da cui il nome). Questo tipo cellulare è coinvolto sia nella reazione di difesa, attraverso la secrezione di citochine immunomodulatorie che mediano la risposta dei fagociti (Ballarin et al, 2001), sia nella reazione di rigetto che si verifica quando due colonie geneticamente non compatibili entrano in contatto: esse si infiltrano nella tunica attraverso l'epitelio ampollare e degranulano con il conseguente rilascio di fenolossidasi (PO) e la produzione di melanina che viene depositata nelle masse necrotiche che si formano così lungo il margine della colonia (Sabbadin et al, 1992; Ballarin et al 1998;2001). Studi recenti hanno mostrato che le cellule morulari attivate sono in grado di produrre anche una grande quantità di fibrille amiloidi che guidano l'accumulo della melanina.

3) **Cellule di accumulo** (nefrociti e cellule pigmentate; Figura 1.3f)

Le cellule pigmentate hanno un diametro di 10-20  $\mu\text{m}$  e contengono grossi vacuoli con granuli cristallini di pigmento di vari colori (blu-viola, giallo, arancio, rosso) in moto browniano, che conferiscono alla colonia la colorazione caratteristica. I nefrociti possono invece raggiungere i 40  $\mu\text{m}$  di diametro e, all'interno di grandi vacuoli, accumulano i cataboliti azotati sotto forma di cristalli di urati (Sabbadin e Tontodonati, 1967; Milanesi e Burighel, 1978).





**Figura 1. 3.** Emociti di *B. schlosseri* colorati con Giemsa (a, b, c, d, e) e con Trypan Blue (f). AI= amebocita ialino; AG= amebocita granulare; CM= cellula morulare; CP= cellula pigmentata; E= emoblasto; M= cellula macrofago-simile; N= nefrocita.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

I pattern di espressione genica vengono oggi largamente utilizzati per identificare l'esposizione degli organismi a condizioni ambientali stressogene (Jeppe et al, 2014). Le reazioni che consentono ad un organismo di sopravvivere anche in condizioni stressogene possono essere sfruttate quindi come parametri per studiare, ad esempio, gli effetti sub-letali indotti dallo stress negli organismi esposti (Adams et al, 1989; Ham et al, 1997). Questo tipo di approccio trova larga applicazione in studi di monitoraggio ecologico e di valutazione del rischio ecologico.

Con il mio progetto di tesi ho voluto valutare il possibile utilizzo dell'ascidia coloniale *B. schlosseri* come *biomarker* per quanto riguarda l'ambiente lagunare.

Il lavoro svolto, è diviso in due parti principali. La prima, svolta direttamente sul campo, ha previsto l'esposizione delle colonie di *B. schlosseri* a diverse condizioni ambientali e la caratterizzazione, sia chimico-fisica che ecologica, dei siti scelti per l'esposizione degli organismi. La seconda parte si è incentrata sull'analisi delle modificazioni di un subset di geni già studiato in *B. schlosseri* e che si sa essere coinvolto nella risposta allo stress ossidativo (Franchi et al, 2015, sottomesso).

Le analisi svolte in laboratorio hanno riguardato tre aspetti principali:

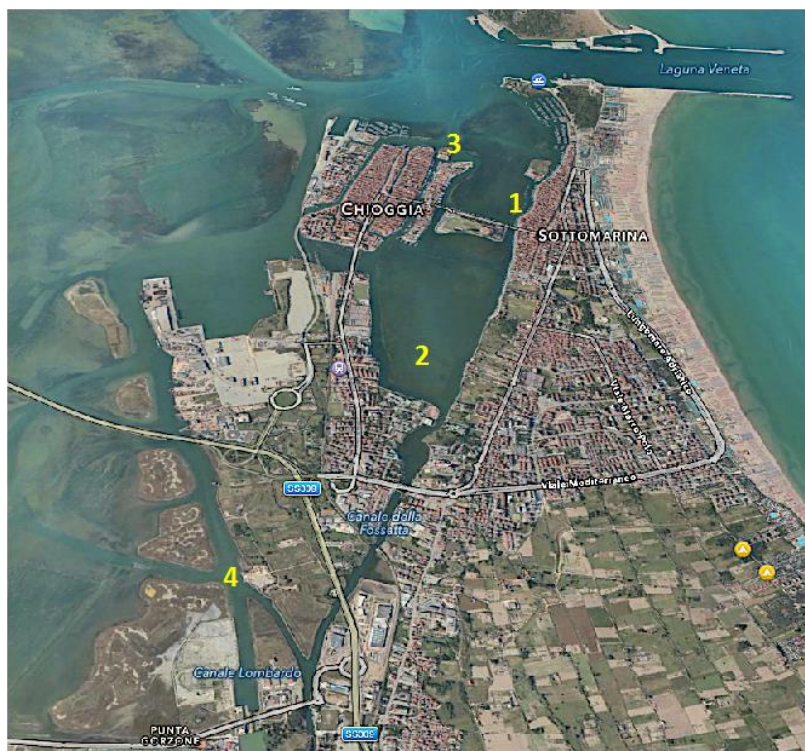
- Modificazioni a livello trascrizionale nell'espressione dei geni scelti
- Modificazione dell'attività degli enzimi superossido dismutasi e catalasi
- Localizzazione nell'organismo *in toto* dei trascritti corrispondenti a tali geni

### **3. METODICHE SPERIMENTALI**

#### **3.1 Stazioni di campionamento**

Per lo scopo di questo lavoro sono stati scelti 4 diversi siti di campionamento (Figura 3.1):

- Sito 1: Pontile nella Laguna tra Chioggia e Sottomarina (N 45°13'4.2672" E 12°17'22.9056"). Il pontile galleggiante modulare è situato vicino alla bocca di porto di Chioggia e ad una trentina di metri lontano dalla banchina. Presenta bassa idrodinamicità e un modesto traffico da natanti dovuto al loro ormeggio su tale pontile.
- Sito 2: Laguna di Lusenzo (N 45°12'20.322" E 12°16'55.3584"). È una Laguna più interna rispetto alla bocca di porto e presenta bassa idrodinamicità e nessun traffico dovuto a natanti data l'assenza di ormeggi nelle vicinanze e una secca che occupa gran parte della Laguna.
- Sito 3: Vasche della Stazione Idrobiologica "Umberto d'Ancona" (N 45°13'23.379" E 12°17'3.991"). Le vasche, situate all'interno della Stazione Idrobiologica, sono quelle in cui normalmente vengono conservate le ascidie che vengono poi utilizzate nei vari esperimenti.
- Sito 4: Canale Lombardo (N 45°11'30.2676" E 12°16'7.5396"). È un canale interno, distante dalla bocca di porto, in cui l'idrodinamicità è bassa e l'acqua è piuttosto stagnante.



**Figura 3.1** Localizzazioni dei siti utilizzati nella ricerca.

1. Pontile galleggiante;
2. Laguna di Lusengo;
3. Stazione Idrobiologica;
4. Canale Lombardo.

### 3.2 Sistema per l'alloggiamento delle ascidie

In ogni sito, ad eccezione delle vasche, è stata posizionata una scatola di plexiglass aperta nella parte superiore ed inferiore di 21x12x7 cm con 10 scanalature per l'alloggiamento di vetrini 10x6 cm su cui sono stati posizionate le colonie di *B. schlosseri* rivolte verso il basso (Figura 3.2). Ogni scatola è stata poi inserita in un sacco a rete nel quale sono state poste due pietre con funzione di zavorra. Il tutto è stato poi legato con una corda e appeso ad un pilone a circa 10 cm dalla superficie dell'acqua. In ogni scatola sono stati alloggiati 7 vetrini. I primi 3 vetrini rappresentano 4 subcloni di 3 colonie di *B. schlosseri*: la colonia 1 divisa nei campioni 1S1, 2S1, 3S1 e 4S1, la colonia 2 divisa nei campioni 1S2, 2S2, 3S2 e 4S2 e la colonia 3 divisa nei campioni 1S3, 2S3, 3S3 e 4S3 (campioni S, singoli). Gli altri 4 vetrini, per ciascun sito, portavano colonie scelte casualmente (campioni P, pool).



**Figura 3.2** Assemblamento della scatola contenente le ascidie.

### 3.3 Attività di campionamento

Gli animali sono stati esposti per un periodo di 22 giorni (dal 23/03/2015 al 14/04/2015) e poi trasferiti in laboratorio nella propria acqua. Sono stati in seguito tutti fotografati identificando le colonie morte e quelle ancora vive. Gli esemplari vivi sono stati suddivisi in campioni, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

I campioni S sono stati ricavati da 4 sistemi derivanti dalla singola colonia S (es. campione 1S1= 4 sistemi della colonia 1S1).

I campioni P sono stati ottenuti allestendo un pool con 4 sistemi provenienti da ogni colonia P del sito specifico, per un totale di 16 sistemi per campione (es. campione 1P1= 4 sistemi da colonie 1P1, 1P2, 1P3 e 1P4). Per la successiva analisi di ibridazione *in situ*, 2 sistemi di ogni colonia sono stati trasferiti in acqua di mare e anestetico (MS 222, Sigma, St. Louis, MO) per 5 min e successivamente in tampone MOPS (0,1 MOPS, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM EGTA, 0,5 M NaCl) e 4% paraformaldeide per 2 h. Sono stati poi disidratati e conservati in freezer a -20°C in etanolo al 70%.

I dati chimico-fisici dell'acqua dei siti scelti sono stati raccolti il giorno del campionamento attraverso una sonda multiparametrica portatile a tenuta stagna, Cyber Scan PC300 (Eutech Instruments).

La caratterizzazione ecologica dei siti è stata condotta attraverso un'analisi dei popolamenti bentonici. È stato eseguito il grattaggio del substrato su un'area di 16x16 cm in ogni sito e i campioni sono stati trasferiti in laboratorio per il

riconoscimento delle specie presenti attraverso il microscopio da dissezione. Le specie sono state identificate attraverso la consultazione di atlanti e manuali di riconoscimento.

### 3.4 Estrazione RNA

L' RNA totale è stato estratto dalle colonie di *B. schlosseri* ponendo le stesse in una soluzione di c-TAB e  $\beta$ -mercaptoetanololo (2%). Le colonie sono state omogenate manualmente con un pestello di vetro ed incubate a 65°C per 1 h. Successivamente è stato aggiunto un volume di fenolo:cloroformio:isoamil alcool in rapporto 24:24:1 e, dopo agitazione con vortex per 10 s, il tutto è stato centrifugato a 3500 rpm a 4°C per 15 min. La fase acquosa è stata trasferita in una nuova provetta alla quale è stato aggiunto un volume di etanolo al 96% pari alla metà del volume raccolto. Il campione così ottenuto è stato processato con il kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wi).

### 3.5 Retrotrascrizione da RNA a cDNA

La quantità di RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm, mentre la qualità è stata derivata dal rapporto  $A_{260}/A_{280}$  e dalla corsa elettroforetica in 1% agarosio.

Per la reazione di sintesi del cDNA è stata utilizzata la seguente miscela di reazione:

RNA <sub>tot</sub>	1 µg
Random Primers 500 µg/ml	1 µl
H <sub>2</sub> O mQ	X µl
<b>Volume finale</b>	<b>5 µl</b>

Questa prima miscela è stata incubata a 70°C per 5 min e successivamente unita alla seconda miscela di reazione:

ImProm II 5X Reaction Buffer (Promega)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Recombinant RNasin (Promega)	0,5 µl
ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega)	1 µl
H <sub>2</sub> O mQ	6,1 µl
<b>Volume finale</b>	<b>15 µl</b>

Il tutto è stato quindi incubato in termociclatore con il seguente profilo termico: 25°C per 5 min, 42°C per 1 h, 70°C per 15 min.

### 3.6 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR)

La sqRT-PCR è una tecnica di analisi di espressione del messaggero, basata sull'analisi dell'intensità di bande risolte in elettroforesi, ottenute in seguito a reazione di PCR in condizioni controllate. Per mettere a punto questa tecnica è infatti necessario verificare l'andamento di espressione durante i cicli di PCR per ogni gene preso in considerazione. Per prima cosa si individua il numero corretto di cicli per ogni gene che corrisponde al momento in cui l'amplicone che si va ad analizzare si trova nella fase esponenziale di amplificazione. Si procede poi con l'amplificazione del trascritto di interesse e del gene housekeeping ( $\beta$ -actina), cioè del gene la cui espressione non varia nei saggi considerati e che può quindi essere usato per normalizzare l'espressione dei geni di interesse.

I componenti per campione della reazione di sqRT-PCR sono:

<i>Buffer</i> 10X (15mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
Primer F	0,5 $\mu$ l
Primer R	0,5 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
Taq	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O mQ	19,3 $\mu$ l
<b>Volume finale</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

In Tabella 3.1 sono riportati i primer utilizzati per la sqRT-PCR, la dimensione del prodotto di amplificazione ed il numero di cicli ottimale. Tali primer sono stati prima testati, attraverso PCR, per verificarne il corretto funzionamento (Figura 4.5).

I grafici presentati nei risultati rappresentano la quantificazione dell'intensità delle bande in gel di agarosio all' 1,5% contenente etidio bromuro. Tale intensità è stata determinata con il programma ImageJ ver. 10.2 (Bethesda, MD). Il valore di intensità relativo al gene di interesse è stato normalizzato rispetto al corrispettivo valore per la  $\beta$ -actina ( $\beta$ -AC). Per ogni sito è stato poi calcolato il valore di intensità medio di ogni gene.

**Tabella 3.1** Tabella riassuntiva dei primer utilizzati e delle condizioni di amplificazione per l'analisi semi-quantitativa del mRNA.

Descrizione	Sigla	T melting	Dimensione amplificato	Cicli ottimali
GCLM Botrillo specifico FW 1	GBBF1	60	354 pb	36
GCLM Botrillo specifico RE 1	GBBR1			
GS specifico Botrillo FW 1	GSBF1	60	298 pb	30
GS specifico Botrillo RE	GSBR			
GPX5 specifico Botrillo FW	GPBF	60	493 pb	38
GPX5 specifico Botrillo RE	GPBR			
GPX3 specifico Botrillo FW	PXBF	63	243 pb	32
GPX3 specifico Botrillo RE	PXBR			
SOD specifico Botrillo FW	SODF	63	327 pb	30
SOD specifico Botrillo RE 2	SODR2			
$\beta$ -AC FW	AUF2	60	500 pb	28
$\beta$ -AC RE	AUR			

### 3.7 Ibridazione *in situ* (ISH)

Al fine di determinare la localizzazione dei trascritti di interesse è stata utilizzata la metodica dell'ibridazione *in situ* che necessita della costruzione di sonde ad RNA complementari alla sequenza da ricercare (sonda antisenso).

Le sonde sono state prodotte con una miscela di nucleotidi in cui l'uracile (U) è coniugato con una digossigenina che viene riconosciuta da un anticorpo specifico. Coniugata all'anticorpo vi è l'enzima fosfatasi alcalina che, in presenza di un substrato, produce un precipitato colorato. Come substrato è stato utilizzato NBT/BCIP che produce un precipitato blu brillante.



### 3.7.1 Costruzione sonde a RNA

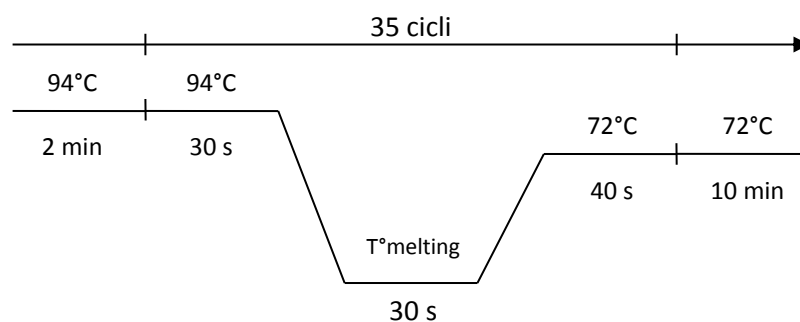
#### 3.7.1.1 Disegno dei primer

Si disegnano i primer specifici per il gene di interesse in modo che producano un amplificato di circa 400 bp.

#### 3.7.1.2 Retrotrascrizione mRNA

Si prosegue con la retrotrascrizione dell'mRNA di *B. schlosseri* in modo da ottenere cDNA. Le miscele e il profilo termico utilizzati sono gli stessi del punto 3.4.3. il prodotto della retrotrascrizione viene poi amplificato attraverso una PCR che utilizza i primer disegnati appositamente per il gene di interesse.

La miscela di reazione utilizzata è la stessa descritta nel punto 3.5.1 ed è stata incubata nel termociclatore con il seguente programma:



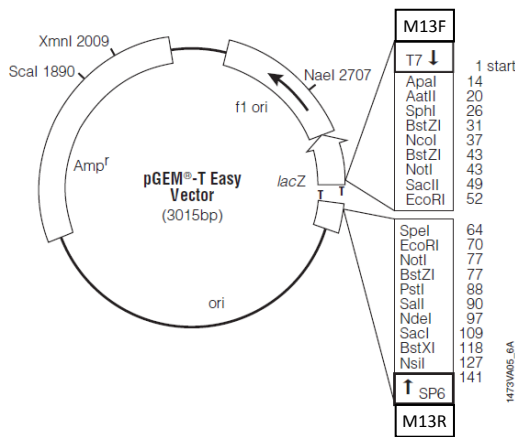
#### 3.7.1.3 Ligazione

Con l'amplificato ottenuto dalla PCR si prosegue con la reazione di ligazione utilizzando il vettore pGEM-T Easy Vector (Figura 3.3) (Promega) a 4°C overnight con i seguenti reagenti:

<i>Rapid Ligation Buffer</i> 2X	2,5 µl
Prodotto di PCR	0,5 µl
pGEM-T Easy Vector (50 ng/ µl)	0,5 µl
T4 DNA Ligasi (3 U/ µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O mQ	1 µl
<b>Volume finale</b>	<b>5 µl</b>

Il vettore utilizzato in questa reazione contiene il gene *amp<sup>r</sup>* che conferisce la resistenza all'ampicillina. In questo modo, usando per la trasformazione batteri

sensibili a tale antibiotico, è possibile selezionare quelli contenenti il plasmide, in quanto saranno gli unici a crescere su terreno selettivo contenente ampicillina.



**Figura 3.3** Schema del vettore pGEM-T Easy.

### 3.7.1.4 Trasformazione

Ad un'aliquota di 17 µl di batteri *E. coli* XL<sub>1</sub>-BLUE chemio-competenti sono stati aggiunti 2 µl di prodotto di ligazione e, dopo un'incubazione in ghiaccio di 20 min, è stato eseguito uno *shock* termico mettendo il campione a 42°C per 45 s e poi nuovamente in ghiaccio per 2 min, permettendo così l'internalizzazione del plasmide.

Ai batteri così trasformati sono stati aggiunti 150 µl di terreno liquido (SOC) a pH 7.0 e il tutto è stato incubato per 2 h a 37°C in agitazione a 200 rpm, in modo da permetterne la crescita.

Sono state infine piastrate aliquote di 150 µl di batteri su terreno solido contenente LB Agar (pH 7.0), ampicillina (concentrazione finale 0,1 mg/ml), X-Gal (2%) e IPTG (0,1 M) 0,4%. Le piastre sono state quindi incubate in stufa a 37°C overnight per permettere la crescita delle colonie. Di seguito le composizioni dei terreni sopra riportati:

	Triptone	Estratto di lievito	Agar	Glucosio	NaCl	KCl	MgSO4
<b>LB</b>							
<b>Agar</b>	1%	0,50%	1,50%	-	10 mM	-	-
<b>SOC</b>	-	0,50%	-	20 mM	10 mM	2,5 mM	20 mM

### 3.7.1.5 Screening delle colonie

Per l'individuazione delle colonie correttamente trasformate, e quindi contenenti la sequenza di interesse, sono stati effettuati due tipi di *screening*.

*Screening* visivo: sfruttando il meccanismo dell' $\alpha$ -complementazione è possibile distinguere ad occhio le colonie contenenti il vettore con l'inserito (di colore bianco) e quelle contenenti invece il vettore richiuso su sé stesso (di colore blu).

*Screening* mediante PCR: sottoponendo le colonie a una PCR di controllo con i primer M13F e M13R, che si appaiano alle regioni del vettore fiancheggianti il sito di clonaggio del vettore pGEM. Dopo elettroforesi in gel di agarosio è stato possibile distinguere le colonie che contenevano un inserto delle dimensioni attese.

### 3.7.1.6 Purificazione del DNA plasmidico

Ogni colonia risultata positiva allo screening è stata fatta crescere in un terreno liquido LB Broth a pH 7.0 (nella tabella sottostante ne sono indicati i componenti), in agitazione a 37°C overnight. Il giorno successivo 2 ml di coltura stazionaria sono stati centrifugati per far sedimentare le cellule. Il DNA plasmidico è stato quindi purificato con il kit ULTRAPrep PLASMID DNA mini prep (AHN Biotechnologie), seguendo le indicazioni fornite dalla casa costruttrice ed infine quantificato come descritto al punto 3.4.2.

	<b>Tryptone</b>	<b>Estratto di lievito</b>	<b>Agar</b>	<b>Glucosio</b>	<b>NaCl</b>	<b>KCl</b>	<b>MgSO4</b>
<b>LB Broth</b>	1%	0,50%	-	-	10 mM	-	-

### 3.7.1.7 Sequenziamento

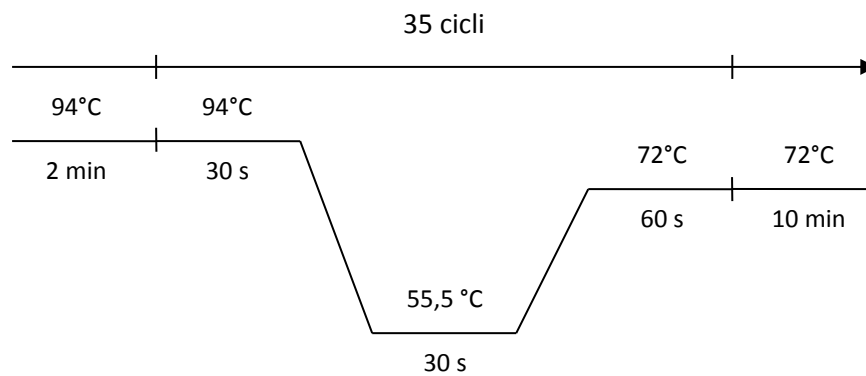
Il sequenziamento è stato eseguito presso il BMR Genomics mediante un sequenziatore automatico modello ABI 3730XL a 96 capillari che usa il metodo Sanger.

### 3.7.1.8 Verifica dell'inserto

Una volta ottenuto il sequenziamento dell'inserto, questo è stato tradotto in silico in sequenza amminoacidica attraverso il programma Expasy Translate Tool ed analizzato mediante BLAST. Tramite il programma CLUSTAL W si ottiene poi un allineamento multiplo che ha permesso di confermare la correttezza della sequenza.

### 3.7.1.9 Amplificazione

È stata diluita 1:100 la mini prep con la quantificazione maggiore e con questa è stata poi eseguita una PCR usando la miscela di reazione descritta nel punto 3.5 e gli M13 come primer in modo da amplificare l'inserto. La miscela di reazione è stata incubata nel termociclatore con il seguente programma:



I prodotti di PCR sono stati successivamente separati mediante corsa elettroforetica in un gel di agarosio all'1,5% in modo da verificare di aver ottenuto l'amplificazione della banda corretta in base alla dimensione rilevata grazie all'utilizzo di un marcatore di peso molecolare (100 bp, BioRad).

### 3.7.1.10 Produzione della sonda

L'inserto amplificato viene incubato per 3 ore a 37°C con la seguente miscela di reazione:

<i>Transcription optimized Buffer 5X</i> (Promega)	4 µl
DTT 0,1 M (Promega)	2 µl
RNase inhibitor (Jena Bioscience)	0,5 µl
rNTPs mix (Roche)	2 µl
DNA (1 µg)	X µl
RNA polimerasi (Promega)	SP6=1,2 µl; T7=2 µl
H <sub>2</sub> O mQ	X µl
<b>Volume finale</b>	<b>20 µl</b>

La scelta dell'enzima RNA polimerasi da utilizzare viene fatta sulla base del verso di inserimento dell'inserto all'interno del vettore plasmidico.

Attraverso purificazione con Mini Quick Spin Columns kit (Roche) si ottiene infine la ribosonda coniugata.

### 3.7.2 Ibridazione *in situ* tecnica "Whole Mount"

I sistemi, precedentemente trattati come descritto nel punto 3.3, sono stati disidratati in scala crescente di Etanolo, divisi a metà e chiarificati in xilene per 30 minuti. I sistemi sono stati successivamente reidratati con i seguenti passaggi:

Etanolo 100%	20 min
Etanolo 90%	20 min
Etanolo 75%	20 min
Etanolo 50%	20 min
Etanolo 30%	20 min

All'idratazione sono seguiti 3 lavaggi in PBST 1X (1,37 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Tween-20, pH 7.2) di 5 min ciascuno, dopodiché i sistemi sono stati incubati per 45 min a 37°C in Proteinasi K 10 µg/ml (Promega) in PBST 1X in modo da degradare parzialmente le proteine di membrana e facilitare l'ingresso della sonda. I sistemi sono stati nuovamente lavati con PBST 1X e lasciati per 30 min nella soluzione di post-fissazione (0,16 g paraformaldeide, 40 µl glutaraldeide 50%, 4 ml PBST 1X). I sistemi sono stati lavati per 3 volte ognuna da 5 min con PBST 1X e incubati con *Hybridization Cocktail 50% Formamide* (Amresco, Solon, OH) per 1 h a 60°C. I campioni sono

stati quindi incubati overnight in una soluzione 1-2 µg/ml di ribosonda specifica per il gene di interesse in *Hybridization Cocktail*.

Il giorno successivo i sistemi sono stati sottoposti a dei lavaggi con le seguenti soluzioni:

<b>Washing solution (WS) 1</b>		<b>Washing solution (WS) 2</b>	
Formamide (final 50%)	5 ml	4 M NaCl (final 0,5 M)	2,5 ml
20X SSC (pH 7.0) (final 5X)	2,5 ml	2 M Tris-HCl (pH 7.5)	0,1 ml
10% SDS (final 1%)	1 ml	10% Tween 20 (final 0,1%)	1 ml
H <sub>2</sub> O mQ	1,5 ml	H <sub>2</sub> O mQ	16,4 ml
<b>Volume finale</b>	<b>10 ml</b>	<b>Volume finale</b>	<b>20 ml</b>

SSC: Saline Sodium Citrate (0,3 M NaCl, 40 mM citrato trisodico, pH 4.5).

Di seguito riporto lo schema dei lavaggi:

- Lavaggio 1: WS 1, 2 volte da 30 min a 60°C
- Lavaggio 2: WS 1 + WS 2 (1:1), 2 volte da 10 min a 60°C
- Lavaggio 3: WS 2, 2 volte da 5 min a 37°C
- Trattamento con RNasi: 10 µl di RNasi 10 µg/µl in 5 ml di WS 2, 30 min a 37°C
- Lavaggio 4: WS 2 5 min a 37°C
- Lavaggio 5: WS 1 + WS 2 (1:1), 2 volte da 10 min a 60°C
- Lavaggio 6: WS 1 10 min a 60°C
- Lavaggio 7: WS 1 + TBST 1X (1:1) 10 min a 60°C

I sistemi sono stati infine lavati in TBST 1X (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20) 10 min per 4 volte a 60°C e trasferiti in vials di vetro. I campioni sono stati poi incubati in ghiaccio e in agitazione con la soluzione di blocco (1% di latte in polvere in TBST 1X) per 4 h in modo da bloccare i siti di legame con l'anticorpo aspecifici. Successivamente i sistemi sono stati incubati overnight con l'anticorpo anti-digossigenina coniugato alla fosfatasi alcalina (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) diluito 1 : 3000 nella soluzione di blocco.

Il giorno successivo i campioni sono stati lavati 3 volte in TBST e poi 3 volte da 3 min l'una in NTMT (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5) e quindi incubate con NBT-BCIP (NBT-BCIP®, SIGMA) diluito 1 : 300 in NTM

overnight al buio in agitazione. La reazione tra l'enzima ed il substrato porta alla formazione di un precipitato di colore blu.

I sistemi sono stati infine lavati con NTMT per 10 min in ghiaccio, con Tris-EDTA per 10 min e con H<sub>2</sub>O mQ per 5 min.

I campioni, disidratati in alcool etilico assoluto, sono stati poi passati in xilene, prima a temperatura ambiente per 30 min e poi a 60°C per ulteriori 30 min. Allo xilene è stato quindi aggiunto il Paraplast plus in un rapporto 1:1 ad una temperatura di 60°C per 1 h, scaduta la quale la miscela è stata rimossa e sostituita con una soluzione pura di Paraplast plus per 1 h a 60°C. I sistemi inclusi sono stati posti in un' apposita formina a 4°C overnight.

Tramite l'utilizzo di un microtomo rotativo Jung sono state poi ottenute sezioni seriali e longitudinali di 7 µm di spessore, lasciate aderire su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser) a 26°C overnight.

I vetrini sono stati infine immersi in xilene per 20 min e montati in *Eukitt* (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA).

### **3.8 Estrazione proteica totale**

Ad ogni campione sono stati aggiunti 250 µl di tampone di estrazione (tampone fosfato 50 mM, pH 8.6, EDTA 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 1 mM + KCl 0,15 M + Saccarosio 0,5 M). I campioni sono stati omogenati attraverso pestello e Ultraturrax e successivamente centrifugati a 10000 rpm per 5 min. Il supernatante è stato poi prelevato e distribuito in aliquote di 100 µl conservate a -20°C

### **3.9 Determinazione della concentrazione totale di proteine**

La determinazione della concentrazione totale di proteine nei campioni è stata eseguita mediante il metodo di Bradford. Il metodo di Bradford per la quantificazione delle proteine è un metodo veloce e accurato. La tecnica è semplice, veloce e meno soggetta ad interferenze rispetto ad altri metodi. Si utilizza il Coomassie Brilliant Blue R-250 che si lega formando complessi non covalenti tramite legami elettrostatici a residui di aminoacidi basici (Arginina e Lisina) presenti nelle proteine. Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del

colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide. Per poter effettuare questo esperimento è necessario costruire una retta di taratura attraverso una serie di diluizioni di una concentrazione nota di BSA. Dal grafico che si ottiene ponendo in ascissa la concentrazione di BSA e in ordinata l'assorbanza letta a 620 nm, si estrapola la retta di regressione lineare che permette di calcolare la concentrazione proteica di un campione conoscendo la sua assorbanza letta a 620 nm.

In una micropiastra sono stati allestiti i seguenti pozzetti per la retta di taratura partendo da una concentrazione nota di BSA di 0,9 mg/ml:

Pozzetto	BSA (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	[BSA] mg/ml	Reagente di Bradford (µl)
1	0	5	0	100
2	1	4	0,18	100
3	2	3	0,36	100
4	3	2	0,54	100
5	4	1	0,72	100
6	5	0	0,9	100

Di seguito sono stati allestiti i pozzetti con i campioni con la seguente composizione: 5 µl di campione diluito 1:5 + 100 µl di Reagente di Bradford.

Il tutto è stato incubato per 10 min e poi letto in un lettore di micropiastre (Sclavo Reader) a 620 nm. L'esperimento è stato eseguito in doppio. Attraverso un calcolatore è stata trovata la retta di regressione lineare e poi ricavate le concentrazioni proteiche dei campioni conoscendo la loro assorbanza.

#### **Reagente di Bradford**

0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250	0,2 g
45 % Metanolo	90 ml
10 % Acido acetico	20 ml
45 % H <sub>2</sub> O mQ	90 ml
<b>Volume finale</b>	<b>200 ml</b>

### **3.10 Saggio di attività enzimatica della superossido dismutasi**

Il saggio si basa sull'attività della xantina ossidasi che catalizza l'ossidazione dell'ipoxantina a xantina producendo radicali liberi. Tali radicali vanno ad agire sul citocromo C riducendolo. Quest' ultima reazione può essere seguita spettrofotometricamente a 550 nm. L'enzima superossido dismutasi inibisce la riduzione del citocromo C competendo per i radicali liberi. In presenza di SOD,



quindi, si ha una variazione di assorbanza per minuto minore rispetto all'assenza di tale enzima.

Per questo saggio sono state preparate le seguenti soluzioni:

- 1) Tampone fosfato per il saggio: tampone 50 mM, pH 8.6, EDTA 0,1 M,  $\text{NaN}_3$  1 mM
- 2) Ipoxantina: 0,018 g in 2 ml NaOH 1 M + 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  mQ
- 3) Xantina ossidasi: xantina ossidasi 11,76 U/ml diluita 1:80
- 4) Citocromo C: 0,02 g in 1 ml di tampone fosfato

In cuvette da 1 ml sono stati aggiunti in ordine i seguenti reagenti:

<b>Bianco</b>		<b>Campione</b>	
Tampone fosfato	960 $\mu\text{l}$	Tampone fosfato	930 $\mu\text{l}$
Ipoxantina	20 $\mu\text{l}$	Ipoxantina	20 $\mu\text{l}$
Citocromo C	10 $\mu\text{l}$	Citocromo C	10 $\mu\text{l}$
Xantina Ossidasi	10 $\mu\text{l}$	Campione	30 $\mu\text{l}$
<b>Volume finale</b>	<b>1 ml</b>	Xantina Ossidasi	10 $\mu\text{l}$
		<b>Volume finale</b>	<b>1 ml</b>

È stata eseguita una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 550 nm ogni 10 s per 30 s. Sono state poi calcolate le unità di SOD per mg di proteine totali utilizzando le seguenti formule:

Attività enzimatica nel campione (U/ml):  $[(A-B)/A] \cdot 100/50$

dove A= assorbanza bianco; B= assorbanza campione

Il risultato è stato moltiplicato per il fattore di diluizione del campione:

$\text{U/ml} \cdot 1000/30$

Tutto infine si divide per il contenuto proteico totale in modo da ottenere le unità di SOD per mg di proteine totali.

### 3.11 Saggio di attività enzimatica della catalasi

Questo saggio si basa sul funzionamento dell'enzima catalasi che scinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Il grado di scissione del perossido di idrogeno può essere seguito tramite lettura spettrofotometrica e risulta nella decremento dell'assorbanza letta a 240 nm.

Per questo saggio è stata preparata una soluzione tampone di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 1X in modo che la sua assorbanza fosse compresa tra 0,520 e 0,550.

In cuvette di quarzo sono state allestite le seguenti miscele di reazione:

<b>Bianco</b>		<b>Campione</b>	
Tampone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS 1X	600 µl	Tampone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS 1X	580 µl
		Campione	20 µl
		<b>Volume finale</b>	<b>600 µl</b>

È stata eseguita una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 240 nm ogni 10 s per 3 min. Sono state poi calcolate le unità di CAT per mg di proteine totali utilizzando la seguente formula:

$$U \text{ CAT/ mg} = |\Delta A_{240} * 100 / \text{mg proteine totali in } 20 \mu\text{l}|$$

### 3.12 Analisi statistica

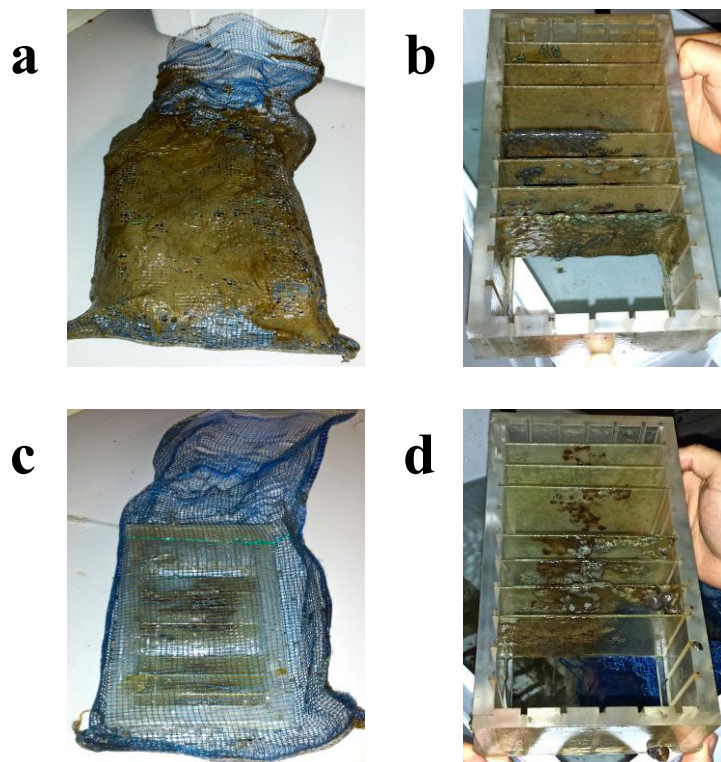
I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard e sono stati comparati attraverso il test *t* di *Student*. Per l'analisi statistica si è utilizzato il programma Primer, versione 1.0, 1987.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Siti di campionamento

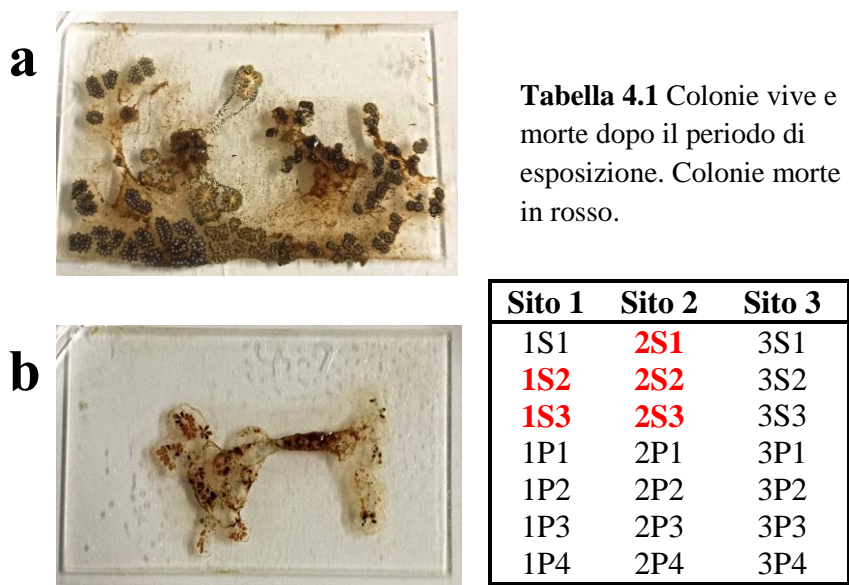
Durante l'attività di campionamento, la scatola posizionata nel sito 4 non è stata più ritrovata e, di conseguenza, il sito è stato rimosso dal disegno sperimentale.

### 4.2 Mortalità delle colonie



**Figura 4.1** Scatole dopo il periodo di esposizione. **a-b.** esterno ed interno scatola del sito 1; **c-d.** esterno ed interno scatola del sito 2.

In Figura 4.1 è riportato lo stato delle scatole dei siti 1 e 2 dopo il periodo di esposizione. Nel sito 1 c'è stata una maggiore deposizione di sedimento e materiale organico sia all'interno che all'esterno della scatola. Le colonie poste nel sito 2 appaiono invece più pulite come anche la rete di protezione esterna alla scatola.



**Figura 4.2** Esempi di colonie dopo il periodo di esposizione. **a.** Esempio di colonia viva (1P3); **b.** esempio di colonia morta (2S2).

In Tabella 4.1 sono riportate le colonie vive e quelle morte dopo il periodo di esposizione. Nel sito 1 le colonie corrispondenti ai campioni 1S2 e 1S3 sono morte mentre nel sito 2 si è avuta una mortalità più alta: tutti gli esemplari corrispondenti alle 3 colonie suddivise nei 3 siti sono morti. Alla luce di questi risultati, si è deciso di proseguire le analisi focalizzandosi solo sui pool di individui che potevano essere paragonati in tutti i siti scelti tralasciando le singole 3 colonie che erano state suddivise per avere lo stesso genotipo distribuito nei 3 siti.

### 4.3 Parametri chimico-fisici dell'acqua di mare

	pH	Temperatura (°C)	Conduttività elettrica (mS)	Salinità (‰)
Sito 1	8.36	16.4	34.7	27
Sito 2	8.64	17.7	40.6	30.5
Sito 3	8.24	16.3	40.6	32

**Tabella 4.2** Parametri chimico-fisici dell'acqua di mare rilevati nei 3 siti indagati. **Sito 1:** pontile galleggiante; **Sito 2:** Laguna di Lusenzo; **Sito 3:** vasche Stazione Idrobiologica "Umberto d'Ancona".

L'analisi chimico-fisica dell'acqua di mare dei siti studiati ha mostrato un leggero aumento di tutti i parametri rilevati tra il sito 1 e il sito 2 (Tabella 4.2). Il sito 3 mostra una salinità più alta rispetto agli altri dovuta, probabilmente, all'evaporazione maggiormente presente nelle vasche e ad un minore ricambio idrico. pH e temperatura sono qui invece più bassi rispetto agli altri due siti indagati.

#### 4.4 Caratterizzazione ecologica dei siti

**Tabella 4.3** Elenco delle specie riscontrate nel grattamento del sito 1.

CLOROFITE	<i>Enteromorpha intestinalis</i> (L.) <i>Ulva lactuca</i> (L.)
RODOFITE	<i>Porphyra leucocista</i> (Thur.)
PORIFERI	<i>Myxilla rosacea</i> (Lieb.)
POLICHETI	<i>Filograna</i> sp. <i>Sensu</i> (Berk.) <i>Amphitrite</i> sp. (Leidy)
BRIOZOI	<i>Bugula neritina</i> (L.) <i>Bugula stolonifera</i> (Ryl.)
MOLLUSCHI	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lam.)
TUNICATI	<i>Botrylloides leachi</i> (Sav) <i>Botryllus schlosseri</i> (Pall.) <i>Styela plicata</i> (Les.)

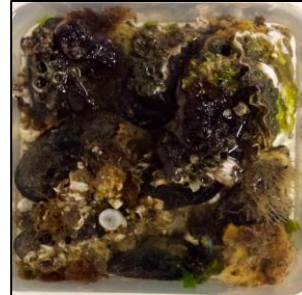


**Figura 4.3**  
Grattaggio del sito 1.

In Tabella 4.3 sono riportate le specie bentoniche identificate nel grattamento effettuato nel sito 1. Il popolamento bentonico appare costituito prevalentemente da macroalghe per lo più Clorofite, Policheti tubicoli, Briozoi e Tunicati.

**Tabella 4.4** Elenco delle specie riscontrate nel grattamento del sito 2.

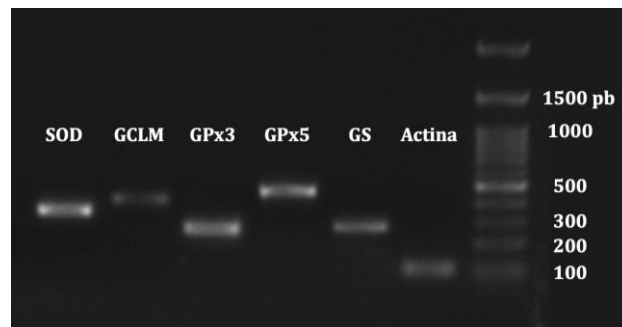
COLOROFITE	<i>Ulva lactuca</i> (L.)
RODOFITE	<i>Porphyra leucocista</i> (Thur.) <i>Ceramium ciliatum</i> (Ellis.) Ducluz.
PORIFERI	<i>Myxilla rosacea</i> (Lieb.)
POLICHETI	<i>Amphitrite</i> sp. (Leidy) <i>Filograna</i> sp. <i>sensu</i> (Berk.) <i>Nereis</i> sp. (Linn.)
BRIOZOI	<i>Bugula neritina</i> (L.) <i>Bugula stolonifera</i> (Ryl.)
MOLLUSCHI	<i>Crassostrea gigas</i> (Thun.) <i>Musculista senhousia</i> (Bens.) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lam.)
CIRRIPIEDI	<i>Balanus</i> sp. (Costa)



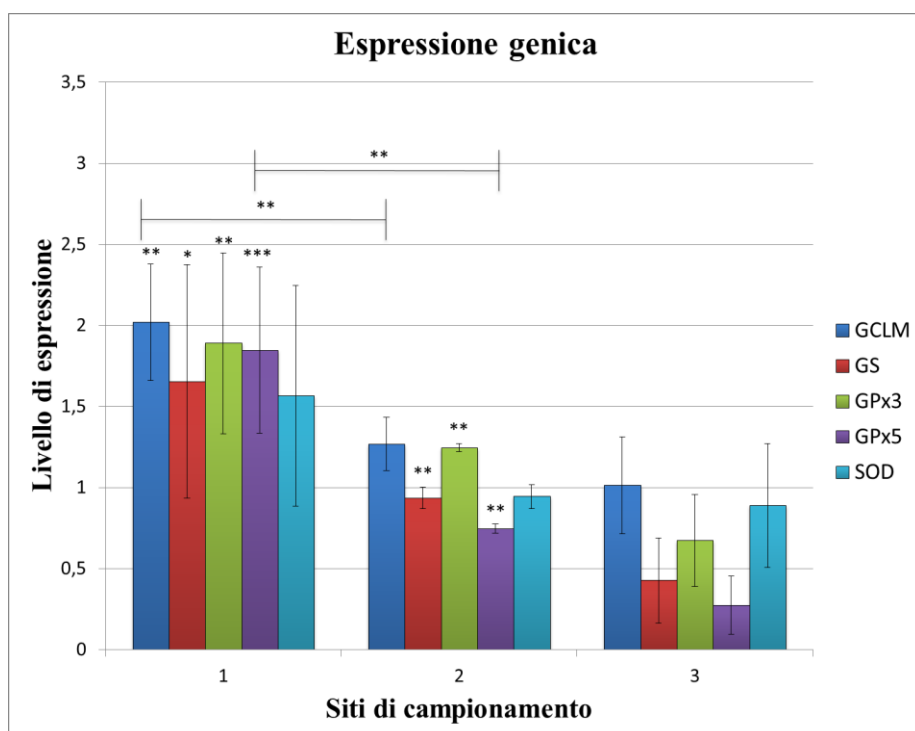
**Figura 4.4**  
Grattamento del sito 2.

In Tabella 4.4 sono riportate le specie bentoniche identificate nel grattamento effettuato nel sito 2. Dalla Figura 4.4 si può notare come il popolamento bentonico della Laguna di Lusenzo sia prevalentemente costituito da Molluschi Bivalvi e Cirripedi. Sono comunque presenti Policheti tubicoli anche se in quantità minore rispetto al sito 1. Completamente assenti i Tunicati.

#### 4.5 RT-PCR semiquantitativa (sqRT-PCR)



**Figura 4.5** Ampliconi ottenuti con i primer specifici per i trascritti di SOD, GCLM, GPx3, GPx5, GS e Actina.



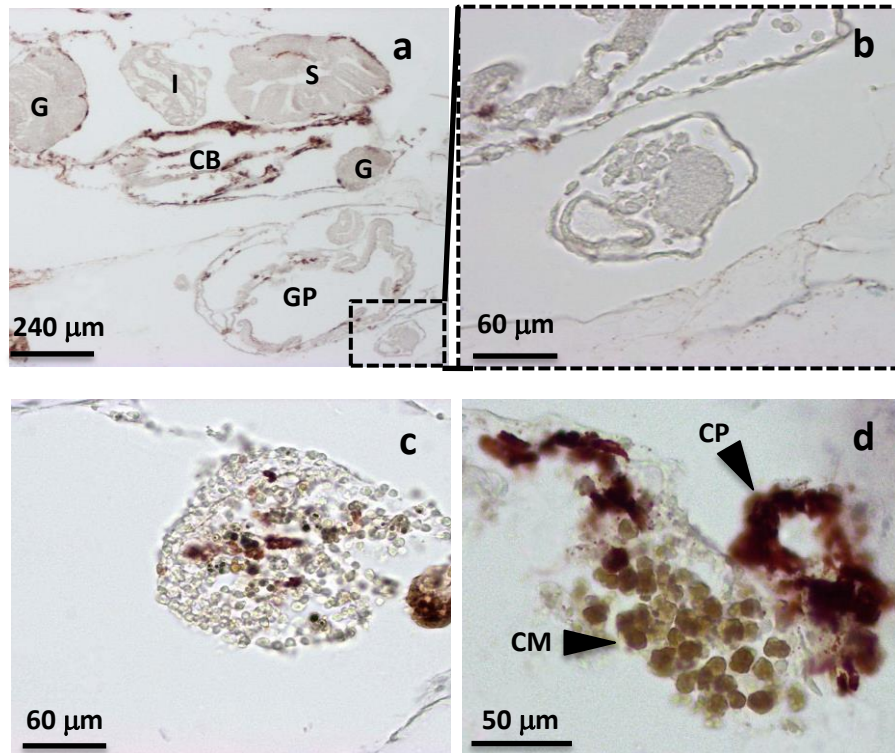
**Figura 4.6** Livelli di espressione medi dell'mRNA di GCLM, GS, GPx3, GPx5, SOD nei 3 siti. Gli asterischi si riferiscono rispetto al controllo (sito 3). \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Le PCR ottenute utilizzando i primer per GCLM, GS, GPx3, GPx5 e SOD hanno fornito ampliconi delle dimensioni corrispondenti a quelle attese (Figura 4.5). L'analisi con sqRT-PCR indica che i valori medi della trascrizione dei singoli geni presi in esami diminuiscono progressivamente dal sito 1 al sito 3, ma solo in alcuni casi risultano differenze statisticamente significative tra i 2 siti indagati e le vasche della Stazione Idrobiologica. Il sito 1 presenta differenze significative rispetto al sito 3 per tutti i geni ad eccezione della SOD mentre il sito 2 presenta



differenze statisticamente significative col sito 3 solo per i geni GS, GPx3 e GPx5. Tra i siti 1 e 2 vi è differenza significativa di espressione dell'mRNA solo per i geni GCLM e GPx5.

#### 4.6 Ibridazione *in situ* (ISH)



**Figura 4.7 a-d:** Esempi di Ibridazione *in situ*. Sezioni istologiche di *B. schlosseri* in paraffina.

**a:** Individuo adulto e gemma primaria. CB= camera branchiale, G= gonadi, GP= gemma primaria, I=intestino, S=stomaco;

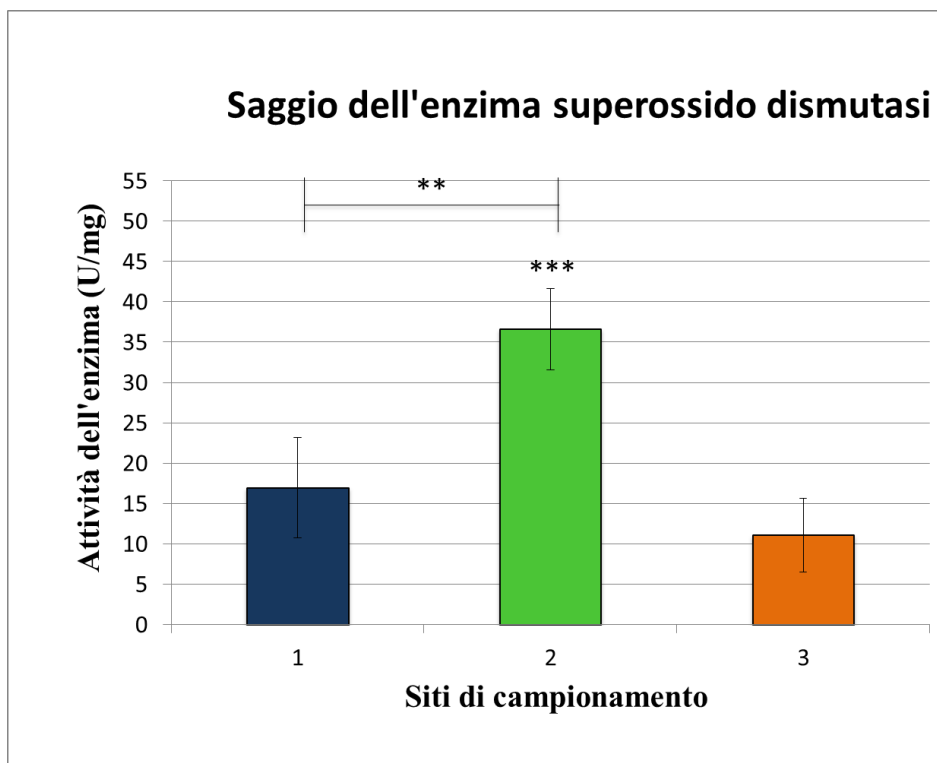
**b:** Gemma secondaria;

**c:** Ampolla con emociti;

**d:** Vaso sanguigno con emociti. CM= cellule morulari, CP= cellule pigmentate.

Non è stata rilevata alcuna marcatura corrispondente ai trascritti dei geni analizzati nelle principali strutture anatomiche interne dei campioni (Figura 4.7 a-d). Ciò può essere dovuto ad un livello trascrizionale basso per essere rivelato tramite ribosonda. Anche negli emociti presenti nel sistema circolatorio non è stata rilevata alcuna marcatura.

#### 4.7 Saggio di attività enzimatica della superossido dismutasi

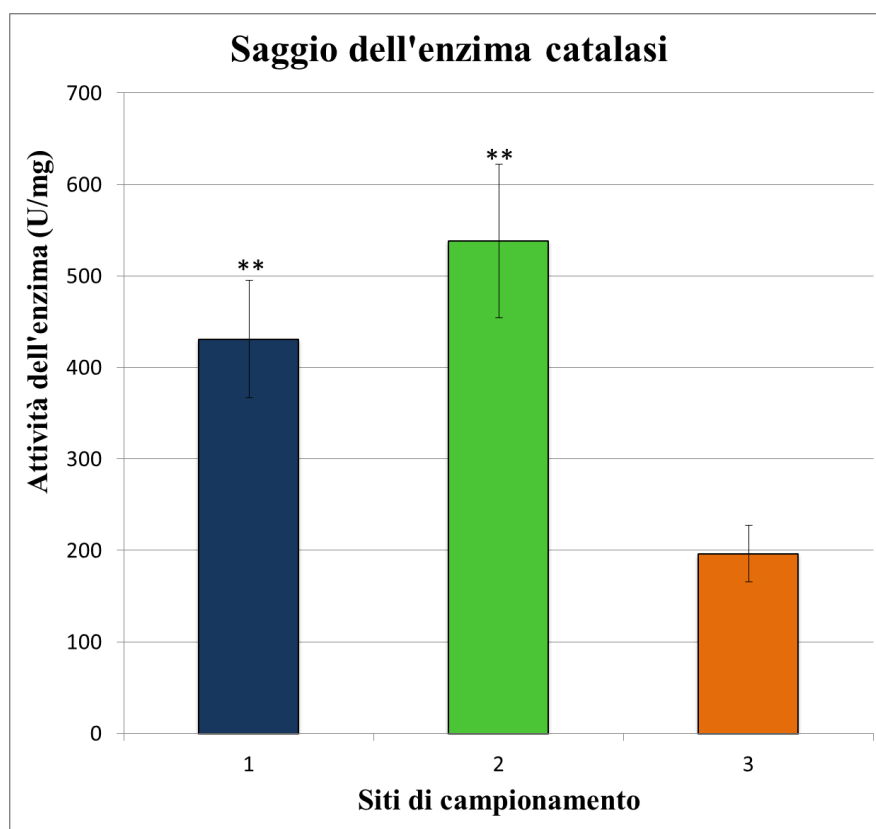


**Figura 4.8** Attività media (U/mg) dell'enzima superossido dismutasi nei 3 siti. Gli asterischi si riferiscono rispetto al controllo (sito 3).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

L'attività della SOD è molto più elevata nella Laguna di Lusenzo (sito 2) rispetto ai siti 1 e 3 (Figura 4.8). Nel caso del confronto tra la Laguna di Lusenzo e le vasche della Stazione Idrobiologica si nota una differenza altamente significativa con  $p < 0,001$ . Non si notano variazioni significative tra i pontili galleggianti (Sito 1) e le vasche della Stazione Idrobiologica Umberto d'Ancona (Sito 3).

#### 4.8 Saggio di attività enzimatica della catalasi



**Figura 4.9** Attività media (U/mg) dell'enzima catalasi nei 3 siti.  
Gli asterischi si riferiscono rispetto al controllo (sito 3).  
\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

In Figura 4.9 è mostrata l'attività media dell'enzima catalasi nei 3 siti. Nei siti 1 e 2 l'attività enzimatica è significativamente maggiore rispetto al sito 3. Non ci sono differenze significative tra i siti 1 e 2.

## 5. DISCUSSIONE

L'influenza dell'ambiente sul trascrittoma o sul metaboloma di un organismo può essere sfruttata in studi di monitoraggio in modo da caratterizzare gli effetti di stress antropogenici come ad esempio l'inquinamento (Van Aggelen et al, 2010). Questo approccio utilizza le risposte degli organismi che vivono in condizioni ambientali non ottimali in modo da poterli usare come sentinelle o *biomarkers* per la valutazione dello stato ecologico dell'ambiente stesso.

Nella maggior parte dei casi gli stress ambientali causano negli organismi una risposta di tipo ossidativo che porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dannose per l'organismo stesso. Analizzare i *pathway* metabolici e le reazioni implicate nella difesa antiossidante è quindi utile per capire l'effetto diretto che una condizione ambientale sfavorevole ha sull'organismo studiato.

In questo lavoro si è analizzata, dopo l'esposizione a diverse condizioni ambientali nella Laguna di Venezia, la trascrizione di un gruppo di geni dell'ascidia coloniale *B. schlosseri* che si sa essere coinvolti nello stress ossidativo: la subunità modulatoria della glutammato cistein ligasi (GCLM) e la glutatione sintetasi (GS), enzimi coinvolti nella sintesi del glutatione, le 2 isoforme di glutatione perossidasi (GPx3 e GPx5), che si ossidano per ridurre i composti tossici, e l'enzima superossido dismutasi (SOD) che rimuove  $O_2^-$  e lo converte in  $O_2$  e  $H_2O$ .

Le colonie di *B. schlosseri* sono state esposte in 3 siti della Laguna di Venezia con condizioni ambientali diverse per 22 giorni, tempo necessario a circa 3 ricambi generazionali, e sono state poi confrontate con colonie mantenute nelle vasche della Stazione Idrobiologica "Umberto d'Ancona" di Chioggia. Tali vasche vengono abitualmente utilizzate per l'allevamento di questo animale e offrono quindi la possibilità di avere un sito di controllo con condizioni ottimali per la crescita di questi organismi. Soltanto in 2 siti è stato possibile recuperare le colonie.

I due siti utili per questo studio si trovano a diversa distanza dalla bocca di porto di Chioggia che mette in comunicazione la Laguna con il Mar Adriatico e sono: un pontile galleggiante modulare situato nella Laguna tra Chioggia e Sottomarina, (Sito 1), sottoposto a modesta idrodinamicità data dal traffico dei natanti e dal loro ormeggio sul pontile stesso e la Laguna di Lusenzo più distante dalla bocca di porto, (Sito 2), con bassa idrodinamicità e nessun traffico dovuto a natanti grazie ad una secca che occupa gran parte della Laguna.

Al momento del campionamento, i siti sono stati caratterizzati sia da un punto di vista chimico-fisico sia ecologico, in modo da rilevare le principali differenze. Per quanto riguarda i parametri chimico-fisici dell'acqua di mare, la Laguna di Lusenzo ha mostrato pH, temperatura e salinità più alti rispetto al pontile galleggiante. L'alta salinità non sembra essere una condizione stressante per *B. schlosseri* in quanto anche nelle vasche della Stazione Idrobiologica, a causa della forte evaporazione, si sono riscontrati valori alti per questo parametro. Sono invece temperatura e pH che sembrano influenzare maggiormente questo organismo che sembrerebbe cresce meglio con valori bassi di tali parametri.

Insieme all'analisi chimico-fisica dell'acqua di mare è stata effettuata un'analisi ecologica eseguendo un grattaggio in ogni sito per identificare le principali specie bentoniche presenti. Il popolamento bentonico presente nei pontili galleggianti (Sito 1) è costituito prevalentemente da clorofite, policheti tubicoli e briozoi. Sono state inoltre rilevate 3 diverse specie di Tunicati. La Laguna di Lusenzo (Sito 2) è invece costituita per lo più da bivalvi e cirripedi. In questo sito non è stata inoltre rilevata la presenza di Tunicati che quindi sembrano non essere in grado di sopravvivere in questa condizione ambientale.

I dati rilevati sono stati poi messi a confronto con la condizione delle colonie al momento del campionamento. Sedimento e materiale organico si sono depositati maggiormente sulla scatola porta-ascidie immersa nel sito 1, sia al suo esterno che al suo interno, rispetto a quella posizionata nel sito 2. L'analisi della mortalità e della morfologia delle colonie di *B. schlosseri* sembra seguire lo stato ecologico dei siti descritti sin ora. Nel sito 1 sono morte solo 2 colonie e quelle sopravvissute hanno mostrato una morfologia sana e una notevole crescita rispetto all'inizio dell'esposizione. Nel sito 2 si è avuta invece la mortalità più alta e le colonie sopravvissute mostravano una morfologia sofferente, con un basso

accrescimento rispetto all'inizio dell'esposizione. Questi dati confermano una condizione ambientale avversa nella Laguna di Lusenzo per la sopravvivenza di *B. schlosseri*.

Le analisi successive si sono concentrate sull'espressione di geni coinvolti nello stress ossidativo e già caratterizzati in precedenza in *B. schlosseri* (Franchi et al, 2015, sottomesso). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su campioni costituiti da un pool di 16 sistemi provenienti da 4 colonie geneticamente diverse esposte nello stesso sito in modo da minimizzare la variabilità individuale e concentrarsi soltanto su quella data dall'ambiente.

Le analisi attraverso sqRT-PCR hanno mostrato un livello di espressione dell'intero gruppo di geni quasi doppio nelle colonie provenienti dal pontile galleggiante, (Sito 1), rispetto a quelle poste nelle vasche della Stazione Idrobiologica (Sito 3). Ciò suggerisce un'attivazione della trascrizione di tali geni data dalla condizione ambientale non ottimale in cui questi organismi sono stati posti. Il livello di espressione della SOD è l'unico a non essere statisticamente differente rispetto a quello del sito di controllo (Sito 3). Questa mancanza di significatività è data soprattutto dalla grande deviazione standard probabilmente dovuta alla variabilità individuale non completamente mitigata da un sufficiente numero di individui per pool analizzato. La Laguna di Lusenzo, (sito 2), ha mostrato invece dei livelli di espressione solo di poco superiori rispetto al sito di controllo per quanto riguarda l'intero gruppo di geni analizzato. Ciò potrebbe essere dato dalla condizione estrema in cui gli organismi sono stati esposti: *B. schlosseri* si trova in una condizione di stress, vicina al collasso, tale da non riuscire più a far fronte alla pressione ambientale esterna. Il tutto porterebbe ad una assenza di trascrizione che si manifesta in un basso quantitativo di mRNA. Questa ipotesi è supportata dalle analisi ecologiche descritte in precedenza e dalla morfologia delle colonie di questo sito al momento del campionamento.

Anche le analisi di attività enzimatica allo spettrofotometro confermano questa ipotesi. L'attività enzimatica sia della SOD che della catalasi sono molto più alte nel sito 2 rispetto al sito 1. Nelle colonie provenienti dalla Laguna di Lusenzo (Sito 2) gli organismi si trovano a dover affrontare un forte stress che si manifesta in un'elevata attività enzimatica. Gli individui posti nei pressi del pontile galleggiante situato vicino alla bocca di porto di Chioggia (Sito 1) hanno invece

un'attivazione più modesta di entrambi gli enzimi in risposta ad una pressione ambientale minore.

La localizzazione dei trascritti corrispondenti ai geni analizzati condotta tramite ibridazione *in situ* non ha invece rilevato alcuna marcatura in nessuno dei campioni. Questo può essere dato da un livello di espressione troppo basso per essere rilevato con una ribosonda sull'organismo *in toto*. Anche gli emociti contenuti nei vasi, che in studi precedenti erano stati marcati (Franchi et al, 2015, sottomesso), non hanno mostrato alcuna marcatura.

Tutti i dati raccolti sembrano quindi suggerire che *B. schlosseri* possa essere un buon indicatore per lo stato ecologico di un ambiente lagunare, entro parametri di pH e temperatura in cui questo organismo abitualmente vive. Un ambiente eccessivamente sfavorevole per questo organismo può portare ad una mancanza di dati soprattutto a livello trascrizionale e quindi ad una valutazione incompleta degli effetti che un possibile stato ecologico alterato può avere sull'organismo stesso.

Questo lavoro vuole essere una prima indagine sulle risposte fisiologiche che *B. schlosseri* ha quando viene posto in diverse condizioni ambientali. Ulteriori studi sono necessari per proporre l'ascidia coloniale *B. schlosseri* come *biomarker* per l'ambiente lagunare utilizzando, ad esempio, un maggior numero di individui per campione e caratterizzando ecologicamente i siti scelti in maniera più dettagliata e approfondita.

Di grande interesse può essere studiare singoli cloni provenienti dalla stessa colonia in modo da ottenere campioni geneticamente uguali posizionati nei diversi siti indagati. In questo modo si potrebbe osservare l'influenza che un ambiente diverso ha su un genotipo completamente identico. Inoltre emerge chiara la necessità di accostare a studi di solo carattere trascrizionale anche analisi di attività enzimatiche che possono contribuire a chiarire scenari di trascrizione genica.

## 6. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

**Abele D., Oeschger R., Theede H.** (1994). Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar Ecol Prog Ser*, 106: 101.

**Abele D., Heise K., Pörtner H.O., Puntarulo S.** (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol*, 205: 1831-1841.

**Abele D., Puntarulo S.** (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol* 138A: 405-415.

**Adams S.M., Shepard K.L., Greeley M.S., Jimenez B.D., Ryon M.G., Shugart L.R., McCarthy J.F., Hinton D.E.** (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar Environ Res*, 28: 459-464.

**Arrigo A.P.** (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 27: 936-944.

**Arthur J.R.** (2000). The glutathione peroxidase. *Cell Mol Life Sci* 57: 1825-1835.

**Aruda A.M., Baumgartner M.F., Reitzel A.M., Tarrant A.M.** (2011). Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *J Insect Physiol*, 57: 665-675.

**Bacanskas L.R., Whitaker J., Di Giulio R.T.** (2004). Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories. *Mar Environ Res*, 58: 597-601.

**Ballarin L., Cima F., Sabbadin A.** (1993). Histoenzymatic staining and characterization of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* hemocytes. *Boll Zool* 60: 19-24.

**Ballarin L., Cima F., Sabbadin A.** (1994). Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Urochordata: Ascidiacea). *Anim Biol* 3: 41-48.

**Ballarin L., Cima F., Sabbadin A.** (1998). Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev Comp Immunol* 22: 479-492.

**Ballarin L., Franchini A., Ottaviani E., Sabbadin A.** (2001). Morula cells as the major immunomodulatory hemocytes in ascidians: evidences from the colonial species *Botryllus schlosseri*. *Biol Bull* 201: 59-64.



**Ballarin L., Cima F.** (2005). Cytochemical properties of *Botryllus schlosseri* haemocytes: indications for morpho-functional characterisation. *Eur J Histochem* 49: 255-64.

**Ballarin L., Menin A., Tallandini L., Matozzo V., Burighel P., Basso G., Cima F.** (2008). Haemocytes and blastogenetic cycle in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: a matter of life and death. *Cell Tissue Res*, 331: 555-564.

**Bao Y., Li L., Xu F., Zhang G.** (2009). Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: its gene structure, mRNA expression and recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol* 27: 210-220.

**Boveris A., Cadenas E.** (1982). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Superoxide dismutase*, 2: 15-30.

**Brouwer M., Hoexum-Brouwer T., Cashion R.E.** (1993). A putative glutathione binding site in CdZn-metallothionein identified by equilibrium binding and molecular-modelling studies. *Biochem J*, 294: 219-225.

**Burighel P., Cloney R.A.** (1997). Urochordata: Ascidiacea. In: “*Microscopic Anatomy of Invertebrates. Hemichordata, Chetognata and the Invertebrate Chordates*”. Edited by Frederick W. Harrison: 221-347.

**Cadenas E.** (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 58: 79-110.

**Campa-Córdova A.I., Hernández-Saavedra de Philippis R., Ascencio F.** (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of 62 American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol* 12: 353-366.

**Camus L., Grøsvik B.E., Børseth J.F., Jones M.B., Depledge M.H.** (2000). Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Mar Environ Res*, 50: 325-329.

**Camus L., Gulliksen B.** (2005). Antioxidant defense properties of Arctic amphipods: comparison between deep-sublittoral and surface-water species. *Mar Biol*, 146: 355-362.

**Cassini A., Favero M., de Laureto P.P., Albergon V.** (1997). Cu-Zn superoxide dismutase from *Pagothenia bernacchii*: catalytic and molecular properties. *Antarctic Communities: Species, Structure, and Survival*, Edited by Battaglia B., Valencia J., Walton D.W.H: 266-271.

**Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M., Keller J.N.** (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochem Biophys Acta*, 1773: 93-104.

**Chance B., Sies H., Boveris A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

**Cheng W., Tung Y., Liu C., Chen J.** (2006). Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Sci* 72: 438-449.

**Cima F., Perin A., Burighel P., Ballarin L.** (2001). Morpho-functional characterization of hemocytes of the compound ascidian *Botrylloides leachi* (Tunicata, Ascidiacea). *Acta Zool (Stockh)* 82: 261-274.

**Clark M.S., Peck L.S.** (2009). Triggers of the HSP70 stress response: environmental responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate (*Nacella concinna*). *Cell Stress Chaperon* 14: 649-660.

**Cohen G., Hochstein P.** (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2: 1420-1428.

**Cottin D., Shillito B., Chertemps T., Thatje S., Leger N., Ravaux J.** (2010). Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. *J Exp Mar Biol Ecol* 393: 9-16.

**Dehal P., Satou Y., Campbell R.K., Chapman J., Degnan B., Tomaso A., Davidson B., Gregorio A., Gelpke M., Goodstein D.M.** (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*, 298: 2157-2167.

**Delsuc F., Brinkmann H., Chourrou D., Philippe H.** (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439: 965-968.

**Depledge M.H., Fossi M.C.** (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3: 161-172.

**Dhaunsi G.S., Gulati S., Singh A.K., Orak J.K., Asayama K., Singh I.** (1992). Antioxidants attenuate diabetes-induced activation of peroxisomal functions in the rat kidney. *J Biol Chem* 267: 6870-6873.

**Dickinson D.A., Forman H.J.** (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*, 64: 1019-1026.

**Dunn S.R., Bythell J.C., Le Tissier M.D., Burnett W.J., Thomason J.C.** (2002). Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp. *J Exp Mar Biol Ecol* 272: 29-53.

**Ferro D., Franchi N., Mangano V., Bakiu R., Cammarata M., Parrinello N., Ballarin L.** (2013). Characterization and metal-induced gene transcription of two new copper zinc superoxide dismutases in the solitary ascidian *Ciona intestinalis*. *Aquat Toxicol*, 140: 369-379.

**Fisher W.S.** (1988). Environmental influence on host response. *Am Fish Soc Spec Pubbl* 18: 225-237.

**Franchi N., Boldrin F., Ballarin L., Piccinni E.** (2011). CiMT-1, an unusual chordate metallothionein gene in *Ciona intestinalis* genome: structure and expression studies. *J Exp Zool: Ecological Gen and Phys*, 315A: 90-100.

**Franchi N., Ferro D., Ballarin L., Santovito G.** (2012). Transcription of genes involved in glutathione biosynthesis in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* exposed to metals. *Aquat Toxicol*, 114: 14-22.

**Franchi N., Ballin F., Ballarin L.** (2015). Characterization and transcription studies of genes involved in oxidative stress response in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Aquat Toxicol*, submitted.

**Franco R., Schoneveld O.J., Pappa A., Panayiotidis M.I.** (2007). The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem* 113: 234-258.

**Fujikawa T., Munakata T., Kondo S., Satoh N., Wada S.** (2010). Stress response in the ascidian *Ciona intestinalis*: transcriptional profiling of genes for the heat shock protein 70 chaperone system under heat stress and endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chaperon*, 15: 193–204.

**Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T.** (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immun*, 20: 536-547.

**Galay-Burgos M., Spurgeon D.J., Weeks J.M., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Kille, P.** (2003). Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers*, 8: 229-239.

**Gamalei I.A. Klyubin I.V.** (1996). Hydrogen dioxide as signal molecule. *Tsitologiya+* 38: 1233-1247.

**Gates R.D., Baghdasarian G., Muscatine L.** (1992). Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biol Bull*, 182: 324-332.

**Goodbody I.** (1974). The physiology of ascidians. *Adv Mar Biol* 12: 1-149.

**Gouveia G.R., Marques D.S., Cruz B.P., Geracitano L.A., Nery L.E., Trindade G.S.** (2005). Antioxidant Defenses and DNA Damage Induced by UV-A and UV-B Radiation in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem and Photobiol*, 81: 398-403.

**Ham K.D., Adams S.M., Peterson M.J.** (1997). Application of multiple bioindicators to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. *Ecotox Environ safe*, 37: 53-61.

**Hansen B.H., Romma S., Garmo O.A., Pedersen S.A., Olsvik P.A., Andersen R.A.** (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67: 2241-2249.

**Homblad T., Söderhäll K.** (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172: 111-123.

**Huang C.S., Chang L.S., Anderson M.E., Meister A.** (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268: 19675-19680.

**Huang W.J., Leu J.H., Tsau M.T., Chen J.C., Chen L.L.** (2011). Differential expression of LvHSP60 in shrimp in response to environmental stress. *Fish Shellfish Immunol* 30: 576–582.

**Hughes S., Sturzenbaum S.R.**, (2007). Single and double metallothionein knockout in the nematode *C elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits. *Environ Pollut* 145: 395–400

**Janssens B.J., Childress J.J., Baguet F., Rees, J.F.** (2000). Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *J Exper Biol*, 203: 3717-3725.

**Jeppe K.J., Carew M.E., Long S.M., Lee S.F., Pettigrove V., Hoffmann A.A.** (2014). Genes involved in cysteine metabolism of *Chironomus tepperi* are regulated differently by copper and by cadmium. *Comp Biochem Phys*, 162C: 1-6.

**Ketterer B.** (1982). The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, 13: 161.

**Kondo T., Yoshida K., Urata Y., Goto S., Gasa S., Taniguchi N.** (1993). gamma-Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *J Biol Chem*, 268: 20366-20372.

**Lesser M.P.** (1996). Exposure of symbiotic dinoflagellates to elevated temperatures and ultraviolet radiation causes oxidative stress and inhibits photosynthesis. *Limnol Oceanogr* 41: 271-283.

**Lesser M.P., Farrell J.H., Walker C.W.** (2001). Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *J Exp Biol*, 204: 157-164.

**Lesser M.P., Kruse V.A., Barry T.M.** (2003). Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos. *J Exp Biol*, 206: 4097-4103.

**Lesser M.P., Farrell J.H.** (2004). Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral reefs* 23: 367-377.

**Lesser M.P.** (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68: 253-278.

**Lin Y., Vaseeharan B., Chen J.** (2008). Identification of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following  $\beta$ -glucan and peptidoglycan injections. *Mol Immunol* 45: 1346-1355.

**Lockwood B.L., Sanders J.G., Somero G.N.** (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *J Exp Biol* 213: 3548–3558.

**Maciel F.E., Rosa C., Santos E.A., Monserrat J.M., Nery L.E.** (2004). Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Canadian J Zool*, 82: 1871-1877.

**Manduzio H., Monsinjon T., Galap C., Leboulenger F.** (2004). Rocher B Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat Toxicol* 7: 83- 93.

**Masaki H., Atsumi T., Sakurai H.** (1995). Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Bioph Res Co*, 206: 474-479.

**Matozzo V., Marin M.G.** (2005). 4-Nonylphenol induces immunomodulation and apoptotic events in the clam *Tapes philippinarum*. *Mar Ecol-Prog Ser*, 285: 97-106.

**Matozzo V., Monari M., Foschi J., Papi T., Cattani O., Marin M.G.** (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses. *J Exp Mar Biol Ecol*, 325: 163-174.

**Meister A.** (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220: 472-477.

**Meister A., Anderson M.E.** (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.

**Milanesi C., Burighel P.** (1978). Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I. Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte. *Acta Zool (Stockh)* 59: 135-147.

**Monari M., Matozzo V., Foschi J., Marin M.G., Cattani O.** (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J Exp Mar Biol Ecol*, 325: 175-188.

**Monari M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G.P., Marin M.G.** (2007). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol*, 22: 98-114.

**Pineda M.C., Turon X., López-Legentil S.** (2012). Stress levels over time in the introduced ascidian *Styela plicata*: the effects of temperature and salinity variations on hsp70 gene expression. *Cell Stress Chaperon*, 17: 435-444.

**Potter D.W., Tran T.B.** (1993). Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol Appl Pharm* 120: 186-192.

**Rahman I., Bel A., Mulier B., Lawson M.F., Harrison D.J., Macnee W., Smith C.A.** (1996). Transcriptional regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Bioch Bioph Res Co*, 229: 832-837.

**Reed D.J., Fariss M.W.** (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev* 36: 25S-33S.

**Regoli F., Cerrano C., Chierici E., Chiantore M.C., Bavestrello G.** (2004). Seasonal variability of prooxidant pressure and antioxidant adaptation to symbiosis in the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*. *Mar Ecol-Prog Ser*, 275: 129-137.

**Rowley A.F., Rhodes C.P., Ratcliffe N.A.** (1984). Protochordate leucocytes: A review. *Zool J Linn Soc-Lond* 80: 283-295.

**Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D.** (2007). Zoologia degli invertebrati: un approccio funzionale-evoluzionistico (IV edizione). Edited by Piccin, Padova.

**Sabbadin A., Tontodonati A.** (1967). Nitrogenous excretion in the compound ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas) and *Botrylloides leachi* (Savigny). *Monit Zool It Al* 1: 185-190.

**Sabbadin A.** (1969). The compound ascidian *Botryllus schlosseri* in the field and in the laboratory. *Pubbl Staz Zool Napoli* 37: 62-72.

**Sabbadin A., Zaniolo G., Ballarin L.** (1992). Genetic and cytological aspects of histocompatibility in ascidians. *Boll Zool* 63: 121-131.

**Schramm M., Behrens A., Braunbeck T., Eckwert H., Köhler H-R., Konradt J., Müller E., Pawert M., Schwaiger J., Segner H., Tribskorn R.** (1999). Cellular and biochemical biomarkers. In: *Biomon of Polluted Water. Environ Res Forum*. Edited by Gerhardt A. 98: 33-64.

**Shaw S., Jayatilleke E.** (1990). Ethanol-induced iron mobilization: role of acetaldehyde-aldehyde oxidase generated superoxide. *Free Radical Biol Med* 9: 11-17

**Staats D.A., Lohr D.P., Colby H.D.** (1988). Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology* 123: 975-980.

**Storey K.B.** (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29: 1715-1733.

**Tarchevskii L.A.** (2002). Signal Systems of Plant Cells, Moscow: *Nauka*, 294.

**Thornalley P.J., Vasak M.** (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 827: 36-44.

**Tosatto S.C., Bosello V., Fogolari F., Mauri P., Roveri A., Toppo S., Flohé L., Ursini F., Maiorino M.** (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants & Redox Signaling* 9: 1515-1526.

**Ursini F., Gion M.** (2008). Analisi delle selenoproteine nei tumori. *ABO Project*.

**Van Aggelen G., Ankley G.T., Baldwin W.S., Bearden D.W., Benson W.H., Chipman J.K., Yu L.** (2010). Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Env Health Persp*, 1-5.

**Viguie C.A., Frei B., Shigenaga M.K., Ames B.N., Packer L., Brooks G.A.** (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Phys*, 75: 566-572.

**Woods J.S., Ellis M.E.** (1995). Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury: relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 50: 1719-1724.

**Wright R.K.** (1981). Urochordates. In: *Invertebrate Blood Cells* 2. Edited by Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Academic Press, New York, 565-626.

**Zaniolo G.** (1981). Histology of the ascidian *Botryllus schlosseri* tunic: in particular, the test cells. *Boll Zool* 48: 169-178.

**Zaniolo G., Trentin P.** (1987). Regeneration of the tunic in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Acta Embryol Morpho. Exp* 8: 173-180.

**Ziegler D.M.** (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem*, 54: 305-329.